

**Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B
mittels Zellkulturen**

Friedrich N ü t z e l

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B mittels Zellkulturen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Friedrich N ü t z e l
aus
Bayreuth

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München



Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 25. 07. 1980

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	3
2.1	Allgemeines über Staphylokokken-Enterotoxine (SE)	3
2.2	Biologische Wirkung von SE	6
2.2.1	Wirkung von SE nach oraler Aufnahme	8
2.2.1.1	Klinische Symptome und Wirkung auf den Gesamtorganismus	8
2.2.1.2	Wirkungsmechanismus von SE bei Erbrechen und Diarrhoe	12
2.2.2	Wirkung von SE auf den Organismus nach intravenöser Applikation	13
2.2.2.1	Wirkung auf den Gesamtorganismus	13
2.2.2.2	Verteilung und Lokalisation von SE im Organismus	17
2.2.3	Mitogene Wirkung von SE	19
2.2.4	Wirkung von SE auf Zellkulturen	22
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
3.1	Cytopathogenität von SEB unterschiedlichen Reinheitsgrades	25
3.1.1	Material und Methodik	25
3.1.1.1	SEB	25
3.1.1.2	Zellkulturen	28
3.1.1.3	Versuchsordnung	30
3.1.2	Ergebnisse	31
3.2	Nachweis von SEB in Zellkulturen mittels direkter Fluoreszenztechnik	39
3.2.1	Markierung von SEB mit FITC	39
3.2.1.1	Material und Methodik	39
3.2.1.2	Ergebnisse	43
3.2.2	Zellkulturversuche mit FITC-markiertem SEB	44
3.2.2.1	Material und Methodik	44
3.2.2.2	Ergebnisse	46

	Seite
3.3 Nachweis von SEB in Zellkulturen mittels Immuno- fluoreszenztechnik	48
3.3.1 Markierung von SEB-Antikörpern mit FITC	48
3.3.1.1 Material und Methodik	48
3.3.1.2 Ergebnisse	53
3.3.2 Zellkulturversuche mit SEB und FITC-markierten SEB-Antikörpern	55
3.3.2.1 Material und Methodik	55
3.3.2.2 Ergebnisse	57
3.4 Nachweis von SEB in Zellkulturen mittels Immuno- peroxydasetechnik	60
3.4.1 Markierung von SEB-Antikörpern mit Peroxydase	60
3.4.1.1 Material und Methodik	60
3.4.1.2 Ergebnisse	61
3.4.2 Zellkulturversuche mit SEB und Peroxydase-markier- ten SEB-Antikörpern	63
3.4.2.1 Material und Methodik	63
3.4.2.2 Ergebnisse	65
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
5. ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)	80
6. LITERATURVERZEICHNIS	83

1. Einleitung

Intoxikationen des Menschen durch Staphylokokken-Enterotoxine (SE) stehen heutzutage in vielen Ländern mit an der Spitze der bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen. Dies ist zum einen auf eine Veränderung der Verzehrsgewohnheiten, z.B. erhebliche Zunahme der Verpflegung der Berufstätigen in Betriebskantinen usw., zurückzuführen. Zubereitung, Aufbewahrung und Transport können das Wachstum von enterotoxinogenen Staphylokokken in den Speisen begünstigen, so daß es dann beim Genuß von SE-haltigen Nahrungsmitteln zu Massenerkrankungen kommt. Zum anderen haben allgemein verbesserte Kenntnisse über die typischen Symptome einer SE-Intoxikation und die Entwicklung von praktikablen und zuverlässigen immunologischen SE-Nachweisverfahren dazu geführt, daß früher oft fälschlich als unspezifisch diagnostizierte Erkrankungen als Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung erkannt werden. Mit Hilfe der immunologischen Nachweisverfahren lassen sich jedoch nur die SE nachweisen, für die bisher Antikörper zur Verfügung stehen. Für die Erfassung aller, auch bisher noch nicht identifizierter SE wären daher geeignete biologische Verfahren wünschenswert. Darüber hinaus läßt sich der immer noch nicht endgültig bekannte Wirkungsmechanismus der SE nur im biologischen Verfahren klären. Nachdem bisher in erster Linie Rhesusaffen, teilweise auch Katzen und andere Versuchstiere hierzu verwendet wurden, hat man u.a. auch aus tierschützerischen Gründen erwogen, Zellkulturen einzusetzen. Vorteil der Verwendung von Zellkulturen wäre außerdem, daß die Kultivierung relativ problemlos und kostengünstig ist und daß größere Mengen an einheitlichem Zellmaterial über einen langen Zeitraum zur Verfügung stehen. Allerdings könnten mit Zellkulturen nur bestimmte, auf die Zelle beschränkte, Untersuchungen durchgeführt werden, während Versuche über die Wirkung von SE auf den Gesamtorganismus, Kreislaufsystem usw. weiterhin den Tierversuch erfordern.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Eignung einiger Zellkulturen für den Nachweis von SEB (Ermittlung cytopathogener Eigenschaften) zu testen

und den Einfluß des Reinheitsgrades von SEB auf die Ergebnisse zu bestimmen. Außerdem sollte geprüft werden, inwieweit ein Nachweis von SEB bei Verwendung von ausgewählten Zellkulturen mittels Fluoreszenz-, Immunfluoreszenz- bzw. Immunoperoxidasetechnik möglich ist und wo das SEB zellulär lokalisiert ist.

2. Schrifttum

2.1 Allgemeines über Staphylokokken-Enterotoxine (SE)

Die Staphylokokken-Enterotoxine (SE) werden von einigen Staphylococcus aureus-Stämmen gebildet, wobei die meisten SE-bildenden Stämme gleichzeitig die Fähigkeit zur Koagulase-Produktion haben (BERGDOLL, 1970). Darüber hinaus existiert eine geringe Anzahl von enterotoxigenen, jedoch Koagulase-negativen Stämmen (LOTTER und GENIGEORGIS, 1977). Die SE haben Proteincharakter und werden aufgrund der Tatsache, daß eine Zell-Lysis für ihre Freisetzung nicht erforderlich ist, als bakterielle Exotoxine bezeichnet (MINOR und MARTH, 1976). Sie verursachen bei oraler Aufnahme die für Staphylokokkenintoxikationen typischen Symptome: Erbrechen und Diarrhoe innerhalb von 2-6 Stunden nach Aufnahme der SE-haltigen Nahrungsmittel (BERGDOLL, 1970). Bisher wurden sechs verschiedene SE-Typen gefunden:

Staphylokokken-Enterotoxin	A (SEA): CASMAN (1960)
"	B (SEB): BERGDOLL, SURGALLA und DACK (1959)
"	C (SEC): BERGDOLL, BORJA und AVENA (1965) mit den sich geringfügig unterscheidenden Varianten: C ₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) C ₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967)
"	D (SED): CASMAN et al. (1967)
"	E (SEE): BERGDOLL et al. (1971)
"	F (SEF): THOTA, TATINI und BENNETT (1973)

Die Basis für diese Differenzierung bildet die Reaktion der verschiedenen SE mit ihren spezifischen Antikörpern (BERGDOLL, 1970). Es ist davon auszugehen, daß noch weitere SE, die bisher nicht isoliert und charakterisiert worden sind, existieren (MINOR und MARTH, 1976).

Im lyophilisierten Zustand sind SE flaumige, weiße Substanzen, die sich leicht in Wasser und Salzlösungen lösen (BERGDOLL, 1970). Einige Eigenschaften der SE sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Einige physikalische und chemische Eigenschaften der SE
(nach MINOR und MARTH, 1976)

Eigenschaft	SEA	SEB	SEC ₁	SEC ₂	SED ^x	SEE
Emetische Dosis mcg/Affe (ED 50)	5	5	5	5-10	./.	10-20
Molekulargewicht	27 800	28 366	34 100	34 000	27 000	29 600
Isoelektrischer Punkt	7,3	8,6	8,6	7,0	7,5	7,0
Extinktion ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$)	14,6	14,4	12,1	12,1	./.	12,5

^x nach BERGDOLL (1977)

Die SE sind relativ hitzestabile Proteine, wobei die Hitzestabilität von verschiedenen Faktoren wie vom SE-Typ, Reinheitsgrad, Art des Erhitzungsmediums, Toxinkonzentration, Erhitzungsdauer und -temperatur abhängt. Nähere Angaben finden sich u.a. bei BERGDOLL (1972), MINOR und MARTH (1976), LOCHER (1977) und SCHULTE (1978). SE sind auch gegen proteolytische Enzyme, wie z.B. Papain, Rennin, Chymotrypsin und Trypsin, resistent (BERGDOLL, 1972); lediglich Pepsin kann bei pH 2 die SE-Aktivität zerstören (BERGDOLL, 1970).

Die gereinigten SE sind frei von Kohlehydraten, Lipiden, Nukleinsäuren, Hämolsinen, Apyrase, Koagulase, Fibrinolysin und proteolytischen Enzymen (BERGDOLL, 1970). Sie bestehen aus einer einfachen Polypeptidkette, die sich, je nach SE-Typ, aus 236 bis 296 Aminosäuren zusammensetzt (Tabelle 2).

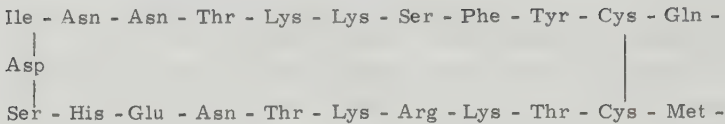
Tabelle 2: Aminosäure-Reste in den SE (nach MINOR und MARTH, 1976)

Aminosäure	SEA	SEB	SEC ₁	SEC ₂	SED ^x	SEE
Lysin	25	33	38	37	28	25
Histidin	7	5	7	7	5	7
Arginin	7	5	4	4	6	8
Asparaginsäure	38	44	53	54	40	38
Threonin	17	13	18	20	12	18
Serin	10	14	18	19	16	16
Glutaminsäure	27	20	24	24	28	28
Prolin	4	6	8	8	4	6
Glycin	15	9	18	17	13	21
Alanin	8	5	9	8	8	10
Halb-Cystin	2	2	2	2	2	2
Valin	14	16	22	20	12	13
Methionin	2	8	8	9	2	1
Isoleucin	10	9	12	12	15	11
Leucin	25	16	20	18	23	26
Tyrosin	19	21	21	21	12	18
Phenylalanin	8	12	12	12	9	9
Tryptophan	2	1	2	2	1	2
Amid-NH ₂	31	30	36	34	30	30
Summe	240	239	296	294	236	259

^x nach BERGDOLL (1978)

Die Aminosäuresequenz von SEA ist teilweise, jene von SEB vollständig bekannt; für SEC, SED, SEE und SEF liegen noch keine entsprechenden Erkenntnisse vor (MINOR und MARTH, 1976). Beim SEB sind die beiden Halb-Cystin-Reste durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (HUANG, SCHANTZ und BERGDOLL, 1975). Die auf diese

Weise gebildete sog. Cystin-Schleife



scheint bei allen SE-Typen vorzukommen (BERGDOLL, 1976). Vom SEA ist zwar erst ein Teil der Aminosäuresequenz der Cystin-Schleife und der anschließenden Aminosäurekette bekannt, doch sind ein zusammenhängender Abschnitt von sieben Aminosäuren beginnend mit einem Halbcystinrest sowie weitere vier Aminosäuren mit dem entsprechenden Abschnitt im SEB identisch (Abbildung 1). Es wird vermutet, daß dieser Teil des Moleküls das aktive (toxische) Zentrum der SE darstellt (HUANG, SCHANTZ und BERGDOLL, 1975). Eine weitere Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz von SEA und SEB besteht bei dem anderen Halbcystinrest. Hier entsprechen sich zwei Aminosäuren unmittelbar neben der Cystin-Bindungsstelle sowie weitere zwei Aminosäuren in der weiteren Aminosäuresequenz von SEA und SEB (Abbildung 1); dieser Teil des Moleküls ist vermutlich das antigene Zentrum der SE.

2.2 Biologische Wirkung von SE

Die Wirkung von SE auf Lebewesen war in den letzten 20 Jahren Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen und Veröffentlichungen. In erster Linie ging es dabei um die Erforschung des Wirkungsmechanismus der SE sowie um die Prüfung der Eignung verschiedener Versuchstiere zum biologischen Toxinnachweis. Für diese Untersuchung verwandte man vor allem den Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) als Versuchstier, da dieser ein ähnliches Reaktionsmuster wie der Mensch aufweist und von allen untersuchten Tierarten - mit Ausnahme des Schimpansen (WILSON, 1959) - die größte Empfindlichkeit gegen SE aufweist. Die Verwendungsmöglichkeit des Rhesusaffen in der SE-Forschung ist allerdings durch die hohen Beschaffungs- und Haltungs-

kosten, durch die sich nach mehrmaliger Verabreichung von SE bald einstellende Immunität sowie auch aus tierschützerischen Gedanken eingeschränkt. Deshalb war man bereits frühzeitig bestrebt, andere Versuchstiere für den spezifischen SE-Nachweis heranzuziehen. Versuche mit Katzen und den üblichen Labortieren wie Hunde, Ratten, Mäuse, Meerschweinchen sowie niederen Lebewesen (Fische, Insekten, Krebse, Frösche, Nematoden, Protozoen und Mikroorganismen) erbrachten keine zweifelsfreien Ergebnisse, die sie für den spezifischen und sicheren SE-Nachweis geeignet erscheinen ließen. Nähere Angaben finden sich bei GANTZE (1976).

2.2.1 Wirkung von SE nach oraler Aufnahme

2.2.1.1 Klinische Symptome und Wirkung auf den Gesamtorganismus

Die Symptome der durch SE verursachten Lebensmittelvergiftung beim Menschen wurden von BERGDOLL (1970) ausführlich beschrieben. Die beiden Hauptsymptome sind - in erster Linie - Erbrechen und Diarrhoe, die sich 1 - 6 Std. nach Nahrungsaufnahme einstellen. Andere Symptome können sein: Speichelfluß, Übelkeit, abdominale Krämpfe, Kopfschmerz, Muskelkrämpfe, Schweißausbruch und Erschöpfung. In schweren Fällen können Körpertemperatur ansteigen oder auch subnormale Bereiche erreichen, Blutdruck absinken und Blut bzw. Schleim im Stuhl und im Erbrochenen auftreten. Die gesundheitliche Wiederherstellung des Erkrankten erfolgt i. d. R. innerhalb von 24-48 Std.; Todesfälle sind sehr selten.

Das Auftreten der o. a. Symptome sowie der Schweregrad und die Dauer der Erkrankung hängen von der aufgenommenen Toxinmenge und von der individuellen Empfindlichkeit des betroffenen Menschen ab (BERGDOLL, 1970; MINOR und MARTH, 1976). Exakte Angaben über die für die Auslösung einer Intoxikation erforderlichen SE-Mengen sind nicht möglich. So konnten RAJ und BERGDOLL (1969) in einem Experiment mit drei freiwilligen Versuchspersonen durch die orale Zufuhr von je 50 mcg SEB (50 % Reinheit) nach 2-4 Std. die typischen Symptome Erbrechen und Durchfall auslösen. In einem weiteren Versuch mit 1 bzw. 10 mcg SEB

(absolute Toxindosis) konnte bei zwei Freiwilligen keine Erkrankung ausgelöst werden (BERGDOLL, 1970), während bereits eine Dosis von 1 mcg SEA pro Versuchsperson eine typische Erkrankung (BERGDOLL, 1970) erzeugte. Die umfassendsten Untersuchungen über die Toxizität von SE beim Menschen stammen von DANGERFIELD (1973). Er stellte die ED 50 (50 % der Versuchspersonen zeigten bei dieser Toxindosis SE-spezifische Krankheitserscheinungen) für unerhitztes SE fest: SEA 0,134 mcg/kg KG; SEB 0,150 mcg/kg KG; SEC 0,183 mcg/kg KG. Bei einer Erhitzung des SEB zwischen 1,6 und 25,4 Min. bei 100°C konnte eine mit zunehmender Erhitzungsdauer deutliche Reduzierung der biologischen Aktivität festgestellt werden. Demgegenüber konnte bei der Erhitzung von SEA, selbst bei einer Erhitzungsdauer von 25 Min., eine Potenzierung der pathogenen Wirkung beobachtet werden: es wurden in diesem Fall schwerwiegendere Erkrankungen als bei der gleichen Dosis unerhitzten SEA beobachtet.

Die bei Laboruntersuchungen festgestellten Zunahmen des Hämatokrit- und Hämoglobinwerts sind vermutlich durch eine von Diarrhoe und Erbrechen hervorgerufene Hämokonzentration bedingt (DANGERFIELD, 1973). Weiterhin konnte eine Leukozytose von 6-12 Std. nach Toxingabe beobachtet werden, die Serumenzym- und -elektrolytwerte waren jedoch nicht signifikant verändert. Untersuchungen über das Vorkommen von SE-Antikörpern im Serum von Menschen zeigten im übrigen, daß 90 % der südostasiatischen Bevölkerung präzipitierende SEB-Antikörper aufweisen im Vergleich zu nur 30 % der Einwohner der USA (McGANN, ROLLINS und MASON, 1971). Bei einer ähnlichen Untersuchung in Polen stellte JOSEFCZYK (1973) bei Patienten mit durch Staphylokokken bedingten Infektionen bzw. Lebensmittelvergiftungen eine deutliche Erhöhung des Vorkommens von SEA-(13, 95%) und SEB-(20, 93%) Antikörpern gegenüber gesunden Menschen (0 bzw. 3, 33 %) fest.

Rhesusaffen zeigen eine ähnliche Reaktion auf eine orale SE-Gabe wie der Mensch. Die Bestimmung der ED 50 von SEB bei Rhesusaffen ergab einen Wert von 0,9 mcg/kg KG (SCHANTZ et al., 1965), wobei als positives

Merkmal für die Toxinwirkung Emesis oder Diarrhoe innerhalb von 5 Std. nach Toxinapplikation gewertet wurden. In anderen Untersuchungen wurde von einer Toxinwirkung nach Applikation von 5 mcg SEA, SEB oder SEC pro Affe (2-3 kg KG) berichtet (CHU et al., 1966; BERGDOLL, 1970; BORJA und BERGDOLL, 1967). Nach Angaben von BERGDOLL et al. (1971) betrug die ED 50 für SEA, SEB, SEC₁ und SEE jeweils ca. 10 mcg pro Tier bei oraler Applikation. Aus der zusammenfassenden Darstellung bei MINOR und MARTH (1976) läßt sich demgegenüber entnehmen (Tabelle 1), daß von SEA, SEB und SEC₁ 5 mcg, von SEC₂ 5-10 mcg und von SEE 10-20 mcg erforderlich sind, um bei oraler Verabfolgung an Rhesus-Affen die typischen Symptome auszulösen. Untersuchungen über die Wirkung von oral verabreichtem SEB (1 mg/kg KG) auf den Organismus von Rhesusaffen erbrachten keine Hinweise auf signifikante Störungen der kardiovaskulären und renalen Funktionen, lediglich die Funktion der Leber war leicht verändert (LIU, DELAUTER und FAULKNER, 1977; LIU et al., 1978). Von SUGIYAMA und McKISSIC (1966) wurde - wie dies auch für den Menschen berichtet wurde - eine starke Leukozytose beobachtet. Immunisierungsversuche zeigten im übrigen, daß eine wiederholte Fütterung von Rhesusaffen mit SEB eine Immunität gegen die 200-fache emetische Dosis bewirkte (BERGDOLL, 1970).

Neben den SEB-bedingten Veränderungen der physiologischen Funktionen des Organismus waren es vor allem die in einzelnen Fällen histologisch und histochemisch erkennbaren Schädigungen von Organen nach oraler Aufnahme von SE, denen besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen am Magen eines durch eine SE-Lebensmittelvergiftung erkrankten Menschen beschrieb z.B. PALMER (1951) nach einer gastrooskopischen Untersuchung: fleckige Hyperämie der Mukosa, regionale Ödeme, Erosionen, Petechien und eitrige Exsudate. KENT (1966) konnte eine durch einmalige Gabe von SEB induzierte akute Gastroenteritis bei Rhesusaffen feststellen, die 2 Std. nach Toxinapplikation einsetzte, nach 4-8 Std. ein Maximum erreichte und sehr rasch wieder abklang, so daß nach 72 Std. der Normal-

zustand nahezu wieder vorhanden war. Die Gastritis war am ausgeprägtesten in der Mukosa des Magen-Fundus und -Antrums. Die Läsionen im Dünndarm nahmen vom Jejunum zum Ileum in ihrem Schweregrad ab. Im Jejunum war das Epithel stark geschädigt, die Darmzotten waren geschwollen und die Krypten bis nahe zur Oberfläche verlängert. Das Ileum zeigte wesentlich geringere Epithelschädigungen und nur leichte Alterationen des Zottenaufbaus. Die von KENT, JERVIS und KUHNS (1966) parallel durchgeführten enzymhistochemischen Untersuchungen des Magen-Darm-Trakts erbrachten folgende Ergebnisse: Die Enzymaktivitäten im oberflächlichen Epithel der Magenmukosa waren trotz der umfangreichen entzündlichen Veränderungen im Fundus- und Antrumbereich nur leicht reduziert, die Aktivität der sauren Phosphatase in den Hauptzellen war geringgradig verstärkt, während die Enzyme in den Nebenzellen keine Veränderungen zeigten. Im Jejunum-Epithel konnte eine rapide Abnahme mit anschließender Wiederherstellung der Enzymaktivitäten konstatiert werden, wobei die Veränderungen der Enzymaktivitäten gut mit den histologisch festgestellten Epithelveränderungen korrelierten. Im Ileum schließlich, das geringe Schädigungen des Epithels aufwies, waren nur ganz geringe Veränderungen in der Enzymaktivität gegeben. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen erweiterten MERRILL und SPRINZ (1968) die Kenntnisse über die Veränderungen im Magen-Darm-Trakt, indem sie nachwiesen, daß die durch intragastrale SEB-Applikation hervorgerufenen Läsionen der Mukosa des Jejunums sich auf die Mitochondrien der Epithelzellen von Zotten und Krypten sowie auf verschiedene Zellen der Tunica propria beschränkten. Diese Veränderungen bestanden vorwiegend in einer Schwellung von Mitochondrien sowie in der Distorsion und Dislokation der Cristae. Die Mitochondrienschwellung manifestierte sich lichtmikroskopisch als zytoplasmatische Vakuolisation und war mit einer Abnahme der enzymatischen Aktivität der betreffenden Zellen verbunden. Die Autoren vertraten aufgrund zusätzlicher Untersuchungen die Ansicht, daß SE als Enzyminhibitoren wirken, damit den Mitochondrien ADP entziehen und somit die Schwellung der Mitochondrien bedingen.

2.2.1.2 Wirkungsmechanismus von SE bei Erbrechen und Diarrhoe

Zweck dieser Forschungen war es, den primären Angriffspunkt der SE im Hinblick auf die Auslösung von Erbrechen und Durchfall zu finden. So konnten SUGIYAMA, CHOW und DRAGSTEDT (1961) feststellen, daß eine bilaterale Zerstörung der Area postrema (medulläre Chemorezeptor-Triggerzone) bei Rhesusaffen diesen einen kompletten Schutz gegen die emetische Wirkung von SEB gab. Aufgrund weiterer Untersuchungen gingen SUGIYAMA und HAYAMA (1965) davon aus, daß der Angriffspunkt für die emetische Aktion der SE bei Affen in den Eingeweiden zu suchen ist und daß der sensorische Stimulus für das Erbrechen via Vagus und sympathische Nerven das Brechzentrum erreicht. Eine komplette Deafferentation (intrathorakale Vagotomie und abdominale Sympathektomie) der Eingeweide führte nämlich dazu, daß Rhesusaffen selbst nach Applikation von letalen Dosen von SEB (sowohl i.v. als auch oral) nicht mehr erbrechen. Eine intrathorakale Vagotomie oder eine abdominale Sympathektomie für sich allein konnte jedoch keinen vollständigen Schutz gegen die emetische Wirkung des SEB geben.

Ein überzeugender Beitrag zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von SEB beim Erbrechen ist dann von ELWELL et al. (1975) erbracht worden. Sie verwandten die Technik der Kreuzzirkulation, bei der die Blutkreisläufe zweier Rhesusaffen verbunden sind, um zwischen neuronalen und humoralen Mechanismen unterscheiden zu können. ELWELL et al. (1975) fanden, daß nur bei dem Affen, dem SEB per os verabfolgt worden war, Erbrechen auftrat, während der andere keine derartige Reaktion zeigte. Auch die Prüfung der Antikörper-Titer erbrachte nur bei dem Affen, dem SEB oral verabreicht worden war, einen positiven Titer, während das andere Tier keine Antikörper produziert hatte. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß das SEB-induzierte Erbrechen durch eine Stimulation des Brechzentrums ausgehend von lokalen neuronalen Rezeptoren im Darm ausgelöst wird und daß kein signifikanter Betrag an SEB bei oraler Applikation vom Darm resorbiert wird. Auch wenn aufgrund dieser Ergebnisse davon auszugehen ist, daß dem Gastrointesti-

naltrakt eine wesentliche Rolle im Hinblick auf das Erbrechen zukommt, ist es bisher jedoch noch nicht gelungen, den primären Angriffspunkt der SE zu identifizieren. Die Ursache für die durch orale Aufnahme von SE hervorgerufene Diarrhoe scheint eine Störung des Wasser- und Elektrolyttransports im Jejunum zu sein. SULLIVAN (1969) stellte im Jejunum von Ratten in vitro eine durch SEB hervorgerufene starke Hemmung der Resorption von Wasser und Chlorid, aber auch von Natrium, Kalium, Glukose und Laktat fest. Später berichteten SULLIVAN und ASANO (1971) sogar von einer Netto-Sekretion von Wasser, Natrium, Kalium und Chlorid insbesondere im mittleren Abschnitt des Rattenjejunums, die 10 Min. nach SEB-Gabe einsetzte und 10 Min. andauerte. Ähnliche Ergebnisse über den Einfluß von SEA, SEB und SEC auf den Wasser- und Elektrolyttransport im Dünndarm von Hunden erzielten SHERMANO, HITCHENS und BEILER (1967), SUSSMAN, RYAN und SHIELDS (1970) sowie ELIAS und SHIELDS (1976). Aufgrund dieser Daten und anderer Untersuchungen auch mit i. v. injiziertem SEB ist davon auszugehen, daß die Diarrhoe in erster Linie auf eine verstärkte Sekretion seitens der Mukosa (insbesondere von Jejunum und Ileum) zurückzuführen ist, weniger aber auf eine verminderte Resorption von Wasser und Elektrolyten. Dabei handelt es sich vermutlich um eine funktionelle Störung, die auch auftritt, ohne daß mikroskopisch wahrnehmbare Veränderungen der Mukosa vorliegen. Nach ELIAS und SHIELDS (1976) kann allerdings bei der Diarrhoe ein sekundärer Effekt infolge SE-induzierter Hypermotilität des Darms nicht vollständig ausgeschlossen werden.

2.2.2 Wirkung von SE auf den Organismus nach intravenöser Applikation

2.2.2.1 Wirkung auf den Gesamtorganismus

Die Übersichtsarbeit von BEISEL (1972) über die bis dahin bekannten Wirkungen (CRAWLEY et al., 1966b, STAAB et al., 1969) intravenös an Affen verabfolgtem gereinigten SEB ist folgendes zu entnehmen: Während bei oraler SEB-Gabe i. d. R. nur Erbrechen und Durchfall zu beobach-

ten waren (siehe 2.2.1), bewirkte in geringen Mengen i.v. appliziertes SEB durchwegs Fieber, Oligurie, Schock, Dyspnoe, Zyanose und innerhalb von 10-20 Std. p.i. Tod (und zwar häufig ohne Erbrechen und Durchfall). Das schwere Schock-ähnliche Syndrom glich in mancher Beziehung dem durch bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) hervorgerufenen Typ. Hinsichtlich der zum SEB-Schock führenden Mechanismen ergab sich, daß dieser nicht auf eine primäre Schädigung von Herzmuskel, Zentralnervensystem, Leber oder Niere zurückzuführen ist, auch wenn vereinzelt Funktionsstörungen dieser Organe zumeist kurz vor dem Exitus (LIU, DELAUTER und FAULKNER, 1977; LIU et al., 1978) oder Veränderungen im subzellulären Bereich - in vitro Schwellung der Mitochondrien der Leber beobachtet wurden (CANONICO und VAN ZWIETEN, 1971). Von wesentlicher Bedeutung für die Entwicklung des Schocks scheint die Ansammlung des Blutes in den peripheren Kapillaren zu sein (BEISEL, 1972). So kommt es während der SEB-Toxämie auch zu einer progressiven Hypotonie mit einem gleichzeitigen Absinken der Aortaflußrate, des mittleren Herzschlagvolumens, des zentralen Venendrucks und des zentralen Blutvolumens, andererseits aber zu einer Zunahme der Herzfrequenz sowie des arteriellen und renalen Gefäßwiderstands. Gleichzeitig steigt der Hämatokrit an, während Erythrozyten-Masse und -Lebensdauer, Totalplasmavolumen und extrazelluläre Körperflüssigkeit sowie Gesamtkörperwasser nahezu unverändert bleiben; außerdem steigen die Lymphflußraten im Ductus thoracicus (BEISEL, 1972; LIU, DELAUTER und FAULKNER, 1977; LIU et al., 1978; PETTIT et al., 1978). Alle diese Daten weisen darauf hin, daß der SEB-Schock zumindest von einer Ansammlung von Blutplasma (und zum geringen Teil auch von Erythrozyten) in den peripheren Gefäßen begleitet ist (BEISEL, 1972). Besonders markant sind die bei der SEB-Toxämie beobachteten Veränderungen in der Lunge (Lungenödeme). Diese Veränderungen sind vermutlich dadurch bedingt, daß Leukozyten als Träger für SEB im Kreislauf und zum Transport in die Lungen dienen (CRAWLEY et al., 1966a) und sich bevorzugt am Kapillarendothel der Lunge ansammeln. Für diese Theorie spricht die Tatsache, daß es bei

kontinuierlicher Infusion von SEB zu einer Leukopenie kam (STILES und DENNISTON, 1971). In die gleiche Richtung weisen auch die Untersuchungen von LIU, GRIFFIN und HILMAS (1978) mit Affen, die vier Tage vor SEB-Injektion einer subletalen Ganzkörper-Röntgenbestrahlung ausgesetzt worden waren. Diese Affen, bei denen es aufgrund der Bestrahlung zu einer Leukopenie kam - und damit zur Einschränkung des SEB-Transports in die Lungen - lebten deutlich länger (Tod trat erst nach durchschnittlich 101 Std. ein) als die Kontrolltiere (Tod nach ca. 15 Std.). Voraussetzung für die Entstehung der Lungenödeme wäre dann eine gesteigerte Permeabilität der Gefäßwände. Nach PETTIT et al. (1978) könnte der SEB-Leukozyten-Komplex über eine Aktivierung des Kinin-Systems für diese gesteigerte Permeabilität und auch für Schäden des Kapillarendothels (FINEGOLD, 1967; STILES und DENNISTON, 1971) verantwortlich sein.

Die histopathologischen Untersuchungen von Organen verstorbener Versuchstiere zeigen auf, daß nur die Lunge durch SEB stark in Mitleidenchaft gezogen wird. So fand FINEGOLD (1967), der verschiedene Organe von Rhesusaffen, denen 15-300 mcg SEB/kg KG injiziert worden war, untersuchte, zwar keine histologisch wahrnehmbaren Veränderungen an den Organen des Gastrointestinaltraktes, Lymphknoten, Herz, Leber, Milz, Niere und Gehirn, wohl aber in der Lunge. Hier beobachtete er nämlich perivaskuläre interstitielle Ödeme, interstitielle Hämorrhagien und Histiozyteninfiltration in allen Lungenlappen. Mit Hilfe des Elektronenmikroskops stellte FINEGOLD fest, daß Degeneration und Nekrose des Endothels der Kapillaren sowie in geringem Umfang Veränderungen des Endothels der kleinen Venen die primären pathologischen Veränderungen waren. STILES und DENNISTON (1971), die SEB in Form einer Dauerinfusion an Rhesusaffen verabfolgten, stellten ebenfalls die stärksten Veränderungen an der Lunge fest (histopathologisch: akute Hämorrhagien und Blutstauung sowie akute perivaskuläre, peribronchiale und intraalveoläre Ödeme mit alveolären Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die von FINEGOLD (1967) beschrie-

benen Läsionen der kapillaren Endothelzellen in der Lunge: niedrige Dosen von SEB führten zur Ablösung und vesikulären Abrundung der Endothelzellen, während höhere Dosen Schwellung und Fragmentation der Endothelzellen verursachten. Nebenniere, Leber, Niere und Milz zeigten keine licht- bzw. elektronenmikroskopisch erkennbaren histologischen Veränderungen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, daß BURIS, SZILAGYI und ZSIGMOND (1967) bei jungen Katzen keine Lungenveränderungen, wohl aber fibrinoide Herzmuskeldegeneration mit mikroskopischen Hämorrhagien und Stasen, Nierenschwellung und eine geringgradige Leberzellnekrose registrierten. Derartige Befunde, die bei einer nicht näher beschriebenen i. v. injizierten SE-Lösung erzielt wurden, sind allerdings später nicht mehr erhoben worden.

Im Rahmen der Forschungen nach den Ursachen des bei intravenöser SEB-Injektion erfolgenden Todes wurden auch andere Parameter geprüft. Die Untersuchung der während einer SEB-Toxämie hervorgerufenen Verschiebung der Körperflüssigkeits-Kompartimente war insbesondere der Gegenstand zweier Untersuchungen, die z. T. mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurden und auch zu teilweise differierenden Ergebnissen führten. RHODA, ELSEBERRY und BEISEL (1970) stellten bei Rhesusaffen nach einer i. v. Injektion von SEB (1 mg/kg KG) fest, daß der Hämatokrit deutlich stieg, aber keine großen Veränderungen der Werte für die Erythrozyten-Masse und -Lebensdauer, das Plasmavolumen, die extrazelluläre Körperflüssigkeit und das Gesamtkörperwasser stattfand.

Im Gegensatz dazu fanden LIU, GRIFFIN und FAULKNER (1976), daß alle Flüssigkeits-Kompartimente mit Ausnahme des Erythrozytenvolumens sich ab der 5. Stunde nach der i. v. -SEB-Injektion signifikant veränderten. Die Werte für das Blut-, Plasma-, Gesamtkörperwasser-, Interstitialflüssigkeits- und Intrazellulärflüssigkeitsvolumen nahmen um 16,2 % bis 20,1 % ab, während sich der Wert für das Extrazellulärflüssigkeitsvolumen um 20,6 % und der Hämatokrit um 9,3 % erhöhte.

Bei der Prüfung der Frage nach den infolge einer i. v. Applikation von SEB (25 mcg/kg KG) auftretenden Veränderungen der verschiedenen

klinisch-chemischen Blutwerte bei Rhesusaffen, stellten CRAWLEY et al. (1966b) fest, daß Blutglucose- und Plasmaproteinwert innerhalb von 24 Std. absanken, während gleichzeitig der Blutharnstoffwert kontinuierlich anstieg. Bei den Serumelektrolyten blieben Na und K unverändert, Ca und Cl nahmen ab, Phosphor dagegen zu. Von den untersuchten Serumenzymen (SGOT, SGPT, LDH und Aldolase) zeigte nur die SGOT einen deutlichen Aktivitätsanstieg innerhalb von 6 Std., während die anderen Enzyme unverändert blieben. Der Serum-Adrenalinwert erreichte nach 3 Std. ein Maximum und sank dann wieder ab; der Noradrenalinwert zeigte keine Veränderung. Diese Ergebnisse wurden von STILES und DENNISTON (1971), den Anstieg von Blutharnstoffwert und SGOT-Aktivität bzw. das Absinken des Plasmaproteinwerts betreffend, bestätigt.

Trotz der umfangreichen Untersuchungen ist die exakte Ursache des SE-induzierten Todes jedoch noch nicht bekannt (LIU, GRIFFIN und HILMAS, 1978). Die Tatsache, daß es nach i.v. Injektion von SE bei Rhesusaffen wiederholt zu Todesfällen ohne vorhergehendes Erbrechen (oder Durchfall) gekommen ist, läßt allerdings den Schluß zu, daß der Wirkungsmechanismus für Erbrechen und Durchfall einerseits und Toxämie andererseits unterschiedlich sein dürfte (BERGDOLL, 1970).

2.2.2.2 Verteilung und Lokalisation von SE im Organismus

Die ersten Untersuchungen über die Blutbindung, Verteilung und Ausscheidung von intravenös injizierten SEB bei Affen wurden von CRAWLEY et al. (1966a) mittels J^{131} -markiertem SEB durchgeführt. Sie stellten fest, daß 60 % des injizierten SEB bereits in weniger als einer Minute aus dem Blutkreislauf verschwunden waren und zu diesem Zeitpunkt etwa 5% des SEB an Leukozyten gebunden waren (nach 15 Min. war es nur noch 1 %). Weiter wurde festgestellt, daß SEB in den Lungen offensichtlich vermehrt zurückgehalten wurde und erheblich länger nachweisbar war als in den anderen Organen (Leber, Milz, Nieren, Herz). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß die Lungen das leuko-

zytengebundene SEB aus dem Kreislauf entfernen. MORRIS, HODOVAL und BEISEL (1967) konnten die Erkenntnisse über die Verteilung im Organismus durch umfangreiche Versuche erweitern.

Tabelle 3: Verteilung der Radioaktivität im Blut, Urin und in verschiedenen Organen nach intravenöser Injektion von radiomarkiertem SEB bei Rhesusaffen (1 mg/kg KG)

Zeitspanne zwischen Injektion und Entnahme (Min.)	Radioaktivität (% des verabreichten J^{131}) in:					
	Blut	Urin	Lunge	Leber	Magen-Darm-Trakt	Niere
10	28	./.	5	24	3	./.
30	9	1	4	20	4	32
120	5	4	4	16	11	23
360	6	11	3	7	26	6

Den in der Tabelle 3 wiedergegebenen Resultaten ist zu entnehmen, daß ein hoher Prozentsatz des SEB nach relativ kurzer Zeit aus dem Blut verschwunden und der Hauptteil des radioaktiv markierten SEB nicht in der Lunge, sondern in der Niere zu finden war. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Feststellung, daß 97 % der Gesamtradioaktivität der Niere in der Nierenrinde lokalisiert waren (30 Min. nach Toxingabe). Die Radioaktivität in Hirn, Herz, Milz und Schilddrüse blieb stets unter 1 %. Weitergehende Beobachtungen ließen erkennen, daß die Tubuluszellen an der Akkumulation des SEB in der Niere beteiligt waren, ohne daß dadurch ihre Funktion beeinträchtigt wurde. RAPOPORT, HODOVAL und BEISEL (1967) stellten dann die auch von STAAB et al. (1969) gestützte Theorie auf, daß SEB in den Glomeruli herausfiltriert und von den Epithelzellen der Tubuli wieder absorbiert und möglicherweise abgebaut wird. Die später von NORMANN, JAEGER und JOHNSEY (1969) erhobenen Befunde bestätigten die Ergebnisse von MORRIS, HODOVAL und BEISEL (1967), daß SEB bereits kurz nach intravenöser Injektion vor allem in der Niere, und

zwar in den Tubuluszellen, zu finden ist. Der früheste Zeitpunkt der Lokalisation in der Niere war 15 Sek. nach i.v. Injektion; das Toxin war dabei auf der luminalen Seite des proximalen Tubulus contortus als eine klare dünne Fluoreszenz-Schicht auf der Zelloberfläche zu sehen. Ab der 15. Min. konnte das Toxin erstmals innerhalb der Zelle an der luminalen Seite nachgewiesen werden, nach 30 Min. war die gesamte Zelle fluoreszierend. Diese und andere hier nicht aufgeführte Daten stützten auch die von RAPOPORT, HODOVAL und BEISEL (1967) aufgestellte Theorie, daß das Toxin durch glomeruläre Filtration und tubuläre Re-adsorption in die renalen Tubuli gelangt. Dieser Mechanismus würde auch eine Erklärung dafür bieten, daß nach vorheriger Applikation von SEB-Antikörpern bzw. bei Tieren mit einem SEB-Antikörpertiter SEB verzögert über die Niere ausgeschieden wird (CRAWLEY et al., 1966 a; MORRIS, HODOVAL und BEISEL, 1967; NORMANN, JAEGER und JOHNSEY, 1969), und zwar aufgrund einer Blockierung der glomerulären Filtration durch den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex (NORMANN, 1970). Weitergehende Untersuchungen ergaben, daß SEB eine Stunde nach intravenöser Applikation nur in den proximalen, nicht aber in den distalen Tubuli lokalisiert war und dort zu niedermolekularen Fragmenten abgebaut wurde (NORMANN, 1971). Diese Fragmente waren sowohl in der Niere als auch im Harn nachweisbar. Der Autor vermutete, daß an diesem SEB-Katabolismus insbesondere in den renalen Tubuluszellen vorkommende lysosomale Kathepsine beteiligt seien. Diese Theorie wurde später von NORMANN und STONE (1972), CANONICO (1973) sowie CANONICO et al. (1974) bestätigt und insofern spezifiziert, als Kathepsin D als für den SEB-Abbau wesentlichste Protease herausgestellt wurde (NORMANN und STONE, 1972; CANONICO et al., 1974).

2.2.3 Mitogene Wirkung von SE

PEAVY, ADLER und SMITH (1970) wiesen als erste auf die mitogene Wirkung von SE auf Lymphozyten hin. Sie verwendeten Lymphozyten aus der Milz von Mäusen bzw. aus dem peripheren Blut von Menschen und beobachteten in vitro eine maximale Stimulation durch 10 bzw. 1 mcg

SEB/ml, GREAVES, JANOSSY und DOENHOFF (1974) sowie SMITH und JOHNSON (1975) gelang es dann nachzuweisen, daß SE die T-Lymphozyten zur Blastbildung und Vermehrung anregten und die B-Lymphozyten nicht oder nur zu einem geringen Teil davon betroffen waren. In ergänzenden Untersuchungen konnte dann festgestellt werden, daß auch SEA (SMITH und JOHNSON, 1975; WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975), SEC_1 (WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975), SED (ARCHER et al., 1978) sowie SEE (SMITH und ARCHER (1978) als T-Lymphozyten-Mitogene wirken. Hinsichtlich der für eine maximale Lymphozyten-Stimulation erforderlichen SE-Mengen sind in der Literatur differierende Angaben zu finden. Für SEB wurden z.B. bei Verwendung von Mäusemilzzellen Werte von 10 mcg/ml (PEAVY, ADLER und SMITH, 1970) bzw. 100 bis 3000 mcg/ml (WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975) genannt. Ob Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen SE-Typen bestehen, ist aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten nicht zu beurteilen. Zwar berichteten WARREN, LEATHERMAN und METZGER (1975), daß SEA, SEB und SEC_1 eine äquivalente mitogene Aktivität aufwiesen doch waren nach Angaben von LANGFORD, STANTON und JOHNSON (1978) bei menschlichen peripheren Lymphozyten 10^{-5} bis 10^2 mcg SEA/ml maximal stimulierend. Es erscheint unwahrscheinlich, daß diese Differenzen allein durch die unterschiedlichen Zellen bedingt sind, zumal PEAVY, ADLER und SMITH (1970) bei entsprechenden Zellen für SEB nur einen Aktivitätsunterschied von einer Zehnerpotenz registriert hatten. Hinsichtlich der für eine maximale Blastbildung erforderlichen Inkubationszeit wird im allgemeinen von drei (bis vier) Tagen ausgegangen. Den Untersuchungen von WARREN (1977) ist zu entnehmen, daß bereits nach 6 Std. mit 1 bzw. 30 mcg SEB/ml versetzte Lymphozyten (Mäusemilz) eine Stimulation der DNA-Synthese aufwiesen, die der nach 50stündiger Inkubation entsprach. Dieser Autor berichtete desweiteren, daß es bereits nach 15minütigem Kontakt von SEB und Mäusemilzzellen (sowohl bei $4^{\circ}C$ als auch bei $37^{\circ}C$) zu einer signifikanten Stimulierung der DNA-Synthese kam.

Während PEAVY, ADLER und SMITH (1970) noch zur Diskussion stellten, ob die SE-induzierte Lymphozyten-Stimulation durch unspezifische Alterationen der Lymphozytenmembran bedingt sei oder durch eine spezifische zellgesteuerte Reaktion, gingen WARREN, LEATHERMAN und METZGER (1975) sowie SMITH und JOHNSON (1975) von der Existenz spezifischer Rezeptoren auf der Lymphozytenmembran aus. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich jedoch offensichtlich nicht um die gleichen Rezeptoren wie für die mitogenen Lektine (Phythämagglutinin, Concanavalin A), die Saccharide bestimmter Konfigurationen enthalten (WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975; SMITH und JOHNSON, 1975). Die Tatsache, daß bei Anwesenheit spezifischer Antiseren SE keine Stimulation der T-Lymphozyten bedingen (WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975; WARREN, 1977; LANGFORD, STANTON und JOHNSON, 1978) dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß es bevorzugt zu einer Reaktion von Antigen und Antikörper (und nicht von Antigen und Rezeptor) kommt oder aber die Rezeptoren durch mitogen unwirksame lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe besetzt werden (WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975).

Zur Klärung der Frage, ob die mitogen wirksame Komponente der SE im SE-Molekül im Bereich der antigenen bzw. toxischen Region oder unabhängig von diesen Zentren lokalisiert ist, wurden entsprechende Versuche mit formaldehydinaktiviertem SEB bzw. mit SEA, SEB und SEC₁ durchgeführt. SPERO, LEATHERMAN und ADLER (1975) konnten dabei zeigen, daß bei pH 5,0; 7,5 oder 9,5 mit 1 % Formaldehyd inaktiviertes SEB trotz Verlust der toxischen (emetischen) Komponente weiterhin mitogen war. Dabei nahm die mitogene Aktivität der Toxoide in der Reihenfolge pH 9,5 - pH 5,0 - pH 7,5 zu, ohne allerdings die Aktivität des nativen SEB ganz zu erreichen. WARREN, LEATHERMAN und METZGER (1975) konnten dann feststellen, daß die antigenen Regionen der Moleküle von SEA, SEB und SEC₁ (die immunologisch keine Kreuzreaktionen aufwiesen) keine wesentliche Rolle für die Aktivität der SE als polyklonale Mitogene spielen. Es kann also angenommen werden,

daß keine Beziehung zwischen der mitogenen Region einerseits und der toxischen bzw. antigenen Region andererseits bei den SE-Molekülen gegeben ist.

2.2.4 Wirkung von SE auf Zellkulturen

Die über die Wirkung von SE auf Zellkulturen vorliegende Literatur ist bereits von ZIETZER (1978) eingehend behandelt worden. Auf eine erneute ausführliche Besprechung kann daher an dieser Stelle verzichtet werden. Die für die verschiedenen Untersuchungen wesentlichen Fakten sind jedoch in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Ergänzend sei hier noch eine Untersuchung von GABLIKS (1972) über die Schutzwirkung von 2,2-bis-(parachlorphenyl)-1,1,1-trichloräthan (DDT) gegen durch SEB-bedingte cytopathogene Effekte (CPE) angeführt. GABLIKS konnte durch die Zugabe von DDT in nicht-toxischen Mengen (sowohl 24 Std. als auch 4 Std. vor bzw. 7 Std. nach SEB-Zusatz zur Zellkultur) die ansonsten durch SEB verursachte Zytotoxizität verhindern. Aus der Tatsache, daß eine Inkubation der Zellen mit DDT über einen Zeitraum von 24 Std. mit anschließendem Entfernen des DDT und folgender Zugabe von SEB die Zellen resistent gegen die cytopathogene Wirkung des SEB machte, schloß GABLIKS, daß DDT direkt auf die Zellen wirkt und nicht das SEB neutralisiert. Er vermutete, daß der schützende Effekt aus einer DDT-bedingten Veränderung spezifischer Rezeptoren resultiert, die für eine Interaktion Zellen/SEB unbedingt erforderlich sind.

Tabelle 4: Übersicht über bisher in der Literatur beschriebene Zellkulturversuche mit SE (1)

Autor	Zell-Linien	Toxin	Versuchsbedingungen	Ergebnisse
MILONE (1962)	HEp-2, HeLa, human embryonic intestine	SEB in versch. Reinheitstufen (5%/20%/80%/95%)	Toxinzusatz nach Dichtwachsen und nach Mediumwechsel	CPE nur bei SEB mit einem Reinheitsgrad von 20% (bis 25 mcg SEB/ml); bei höherem SEB-Reinheitsgrad keine CPE.
KIENITZ und SCHMELTER (1964)	Primäre Affennieren-Zellkulturen	Kulturfiltrat sowie teilweise u. vollständig gereinigtes SEB	Toxinzusatz nach Dichtwachsen der Zellkultur	CPE nur bei Verwendung des Kulturfiltrats; keine CPE bei hochgereinigtem SEB und bei erhitztem Kulturfiltrat (30 Min. bei 100°C)
HALLANDER und BENGTS- SON (1967)	HeLa, Affennierenzellen, prim. menschl. Nierenzellen, prim. fetale Colonzellen, Kälbernierenzellen	gereinigtes SEB (nach SCHANTZ et al., 1965)	Toxinzusatz nach Dichtwachsen der Zellkultur	Keine CPE feststellbar nach einer Zeitspanne von 6 bzw. 16 Std. nach Toxinzusatz
URBACH, OEHRING und BRUNNEN- MANN (1968)	HeLa, Hühnerfibroblastenzellen, Amnionzellen (Fl)	Kulturfiltrat von enterotoxinogenen und nicht enterotoxinogenen Staph. aureus-Stämmen	Toxinzusatz nach Dichtwachsen der Zellkultur	CPE wurden nach 24 bis 48 Std. festgestellt bei Verwendung von erhitztem (100°C/30 Min.) und unerhitztem Kulturfiltrat. Keine CPE bei Verwendung des Kulturfiltrats eines nicht enterotoxinogenen Stammes.
GRIGOROVA und DANON (1968)	prim. menschl. Nieren- und Fibroblastenzellen, HEp-2, KB, Fl, Detroit-6	Kulturfiltrat des Staph. aureus-Stammes 254, Erhitzung 20 Min./80°C	Toxinzusatz nach Dichtwachsen der Zellkultur	nach 24 Std. Versuchsdauer deutliche CPE (Abrundung, Membranrauhigkeit, Kernauflösung).

Autor	Zell-Linien	Toxin	Versuchsbedingungen	Ergebnisse
SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS (1966 und 1967)	human embryonic intestine	SEB, gereinigtes (produziert nach SCHANTZ et al., 1965)	Toxinzusatz nach dem Dichtwachsen der Zellkultur	ED ₅₀ 50 mcg/ml Medium (nach 48 Std.) CPE: Zellretraktion, freischwimmende Zellen, Lochbildung im Zellrasen
SCHAEFFER (1970)	human e. intestine, HeLa, Hep-2, KB, Chang Liver, L-Zellen human foreskin fibroblasts	"	Toxinzusatz nach Dichtwachsen und nach Mediumwechsel	1. CPE nur bei Verwendung von Humanserum, dagegen nicht bei Gebrauch von FKS bzw. Pferdeserum. 2. CPE erst 5-8 Std. nach Toxinzusatz erkennbar. 3. CPE (durch Entfernung des toxinhalt. Mediums) reversibel.
RAKAROWA, STEFANOWA und STANKOWA (1971)	HeLa, Hep-2, Heart, prim. Darmfibroblasten	Kulturfiltrat (SEA)	sofortiger Toxinzusatz (gleichzeitig mit der Aussaat der Zellen)	gleichstarke CPE bei allen Zellkulturen (Ablösung und Abrundung der Zellen)
TERPLAN und ZAADHOF (1976)	prim. Kälbernieren und -milzzellen, Hühnerfibroblasten, HeLa, SK	SEB (Reinheitsgrad 80 - 90%)	sofortiger Toxinzusatz (gleichzeitig mit der Aussaat der Zellen)	1. CPE bei allen Zell-Linien nach 2-3 Tagen erkennbar. 2. Minimale effektive Toxinkonzentration: 15-30 mcg/ml Medium nach ca. 6 Tagen
ZIETZER (1978)	Hep-2, HeLa, MDCK, RK-13, 75SD-G-376, 75SD-C-420 (STAV-ROU et al., 1979) prim. Kälberlungen- und -nierenzellen	SEB (Reinheitsgrad 50%)	"	CPE bei 75SD-G-376 (ab 25 mcg/ml Medium), bei 75SD-G-420, RK-13 und HeLa (ab 50 mcg/ml Medium), bei Hep-2, prim. Kälberlungen und -nierenzellen (ab 100 mcg/ml Medium)

3. Eigene Untersuchungen

Die eigenen Untersuchungen lassen sich in zwei Hauptabschnitte untergliedern. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von SEB unterschiedlichen Reinheitsgrades auf verschiedene Zellkulturen geprüft. Im zweiten Teil der Arbeit wurde dann getestet, ob ein SEB-Nachweis über Zellkulturen mittels direkter Fluoreszenz-, Immunofluoreszenz- oder Immunoperoxidase-Technik möglich ist.

3.1 Cytopathogenität von SEB unterschiedlichen Reinheitsgrades

3.1.1 Material und Methodik

3.1.1.1 SEB

Die Produktion von SEB (Kulturfiltrat) erfolgte mit *Staphylococcus aureus* 10-275 (USA Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick) in der bei HELBER (1977) und LOCHER (1977) beschriebenen Art und Weise. Zur Gewinnung von gereinigtem SEB wurden verschiedene Reinigungen durchgeführt. Für die erste Reinigung wurde Amberlite CG 50 (Serva) eingesetzt (Einzelheiten hierzu bei ZIETZER, 1978). Das mit 0,5 M Phosphatpuffer in 0,25 M NaCl (pH 6,8) eluierte und aufgrund der Extinktion bei 277 nm gepoolte Material wurde dann sterilfiltriert und gegen 0,01 M Phosphatpuffer (pH 6,2) dialysiert. Ein kleiner Teil dieses Materials wurde als SEB I für Zellkulturversuche abgezweigt, lyophilisiert und bis zum Gebrauch luftdicht verschlossen bei -20°C aufbewahrt.

Der größere Teil des Lyophilisats wurde einer zweiten Reinigung unterzogen. Sofern hierfür in Anlehnung an SCHANTZ et al. (1972) Carboxymethylcellulose (CM 22; Whatman) Anwendung fand, wurde der Ionenaustauscher mit 0,01 M Phosphatpuffer (pH 6,2) äquilibriert. Die Elution erfolgte dann mit einem linearen Gradienten (Phosphatpuffer 0,02 M (pH 6,2) bis 0,07 M (pH 6,8)). Die SEB-haltigen Fraktionen (Extinktion bei 277 nm) wurden wiederum gepoolt, gegen Aqua dest. dialysiert und mittels Ultrafiltration (UM 2-Membran; Amicon) konzentriert. Eine

Hälfte des als SEB II bezeichneten toxinhaltigen Materials wurde anschließend lyophilisiert und bei -20°C bis zum Gebrauch luftdicht verschlossen aufbewahrt, während die andere Hälfte für eine dritte Reinigung (s. u.) bestimmt war. Alternativ hierzu wurde die zweite Reinigung in Form einer Gelfiltration mit Sephadex G 75 (Pharmacia) vorgenommen. In entsprechender Weise war auch ZIETZER (1978) bei der Gewinnung von gereinigtem SEB für Zellkulturversuche vorgegangen. Eluiert wurde mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 6,8). Die SEB-haltigen Fraktionen wurden gegen Aqua dest. dialysiert, mittels Ultrafiltration (UM 2-Membran) konzentriert, anschließend lyophilisiert und bis zum Gebrauch luftdicht verschlossen bei -20°C aufbewahrt. Dieses Material wurde, da für die zweite Reinigung Sephadex verwendet wurde, als SEB IIS bezeichnet.

Für die dritte Reinigung des dafür vorgesehenen SEB II diente ebenfalls Sephadex G 75. Elution, Dialyse, Konzentration, Lyophilisation und Aufbewahrung des dreifach gereinigten SEB III erfolgten analog wie beim SEB IIS.

Bei den somit für die Versuche zur Verfügung stehenden vier SEB-Präparationen (SEB I, SEB II, SEB IIS, SEB III) wurden serologische Aktivität bestimmt, Extinktionswerte bei 260 bzw. 277 nm gemessen und Untersuchungen auf die Anwesenheit von Nukleasen und Hämolyseinen durchgeführt. Die Bestimmung der serologischen Aktivität der Lyophilisate erfolgte mittels der einfachen radialen Immunodiffusion (MANCINI, CARBONARA und HEREMANS, 1965) in der im Institut üblichen Weise mit einem 1 % Polyäthylenglykol 6000 (Merck) enthaltenden Agarosemedium (Einzelheiten siehe SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; ZIETZER, 1978). Nach Inkubation (48 Std. bei Zimmertemperatur), Trocknen, Färben und Entfärben wurden die Durchmesser der Präzipitate mit einem hierfür geeigneten Gerät (Meßprojektor für Immunanalyse; Behringwerke) ausgemessen, die der SEB-Konzentration proportional sind. Anhand einer Eichkurve, die mit in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem, auf Konzentrationen von 0,625; 1,25; 2,5 bzw. 5 mcg/ml einge-

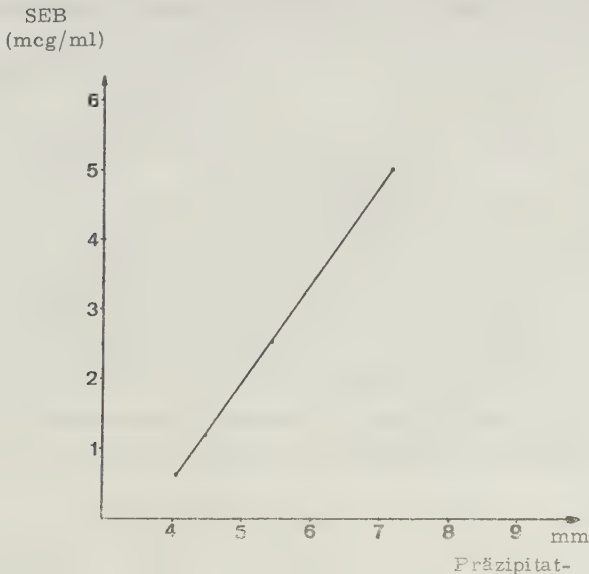
stelltem SEB (Serva) erstellt worden war (Abbildung 2), ließen sich die Toxingehalte der SEB-Präparationen - nach Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung - ermitteln. Der SEB-Gehalt der Lyophilisate wurde rechnerisch unter Berücksichtigung der eingewogenen Menge und der serologischen Aktivität dieses Materials bestimmt.

Die Messung der Extinktionswerte der SEB-Lösungen bei 260 bzw. 277 nm und der sich aus diesen Werten ergebende Faktor ermöglichen eine Aussage über die Anwesenheit von Nukleinsäuren im Material (SCHANTZ et al., 1965). Durchgeführt wurden diese Messungen mit einem Spektralphotometer (Zeiss).

Die Untersuchungen auf Nukleasen erfolgten mit dem von LACHICA, WEISS und DEIBEL (1969) für diese Zwecke beschriebenen Toluidinblau-DNA-Agar (Einzelheiten siehe ZAADHOF, 1978). Da die Nukleasen in ihrer Gesamtheit erfaßt werden sollten, wurde auf die Erhitzung der SEB-Lösungen auf 100°C verzichtet.

Für den Nachweis eventuell vorhandener Hämolysine wurden Rinderblutplatten in der von ZIETZER (1978) beschriebenen Art eingesetzt.

Abbildung 2: Eichkurve zur Bestimmung des Gehalts an SEB mittels der einfachen radialen Immunodiffusion



Die bei den vier verschiedenen SEB-Präparationen durchgeführten, oben beschriebenen Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse: Mit zunehmender Reinigung stieg der serologisch bestimmte SEB-Gehalt der Lyophilisate von 55 % (SEB I) über 57 % (SEB IIS) und 68 % (SEB II) auf 70 % (SEB III) an.

Nukleinsäuren waren in allen vier SEB-Präparationen - wenn überhaupt - nur in geringen Mengen vorhanden (Faktor 260:277 nm lag im Bereich von 0,46-0,51).

Nukleasen wurden insbesondere im SEB I nachgewiesen (++), während ihr Gehalt im SEB II und SEB IIS sehr gering war. SEB III war frei von Nukleasen in nachweisbarer Menge.

Hämolsine waren nur im SEB I vorhanden, nicht aber in den anderen Präparationen.

3.1.1.2 Zellkulturen

Für die Prüfung der Wirkung der verschiedenen SEB-Präparationen wurden folgende Zellkulturlinien verwendet:

Herkunft:

75SD-G-376	(STAVROU et al., 1979)	pleomorphes Mischgliom von der Ratte
75SD-G-420	(STAVROU et al., 1979)	pleomorphes Gliom von der Ratte
HeLa	(ATCC-CCL 2)	menschliches Epithelkarzinom
BHK-21	(ATCC-CCL 10)	Hamsterniere
RK-13	(Flow)	fetale Kaninchenniere

Die Kultivierung der angegebenen Zellkulturlinien (Stamm-Zellkulturen) erfolgte in Gewebekulturflaschen aus speziellem Kunststoffmaterial (Nunc). Für die Herstellung der Nährmedien wurden Trockenmedien (Boehringer) verwendet, die mit Aqua bidest. nach den Angaben des Herstellers aufgelöst wurden. Das für die Zellkulturlinien 75SD-G-376, 75SD-G-420 und RK-13 verwendete Tissue Culture Medium 199 wurde anschließend mit NaHCO_3 auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert, in 500 ml-Transfusionsflaschen abgefüllt und bei $+4^\circ\text{C}$ für maximal 8 Wo-

chen gelagert. Bei den Zellkulturlinien HeLa und BHK-21 fand das Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen Verwendung, das nach dem Auflösen autoklaviert wurde. Kurz vor dem Gebrauch dieses Mediums wurde es durch Zugabe von steriler NaHCO_3 auf pH 7,4 eingestellt und mit sterilem Phenolrot als pH-Indikator versehen. Vor der Zugabe zu den Zellkulturen wurden den Medien pro ml noch 100 IE Penicillin G (Hoechst) und 100 mcg Streptomycin (Grünenthal) zugesetzt. Fetales Kälberserum (FKS) wurde als steriles Erzeugnis vom Hersteller (Flow bzw. Boehringer) bezogen und bei -20°C gelagert. Den Nährmedien wurde es erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt, und zwar in einer Menge von 7,5 % bei der HeLa-Zell-Linie bzw. von 10 % bei allen anderen Zell-Linien.

Als Ausgangsmaterial dienten eingefrorene Zellen (bei -70°C) der oben angegebenen Zellkulturlinien, die aufgetaut und weiter kultiviert wurden (Technik des Gefrierens und Auftauens nach MAYR et al., 1974). Zur Subkultivierung wurden die Monolayer-Zellkulturen, sobald der Zellrasen dichtgewachsen war, mit Saline-Trypsin-Versen-Lösung (STV) abgelöst. Das Splitten der Zellkulturen wurde in folgender Weise vorgenommen: Nach dem Dekantieren des Nährmediums wurden 5 ml STV-Lösung auf die Zellen einer Kulturflasche gegeben und nach einigen Sekunden Einwirkungszeit wieder abgekippt. Daraufhin wurden wiederum 5 ml STV-Lösung in die Kulturflasche pipettiert, leicht geschüttelt und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Trat dann nach erneutem Schütteln der Flasche keine vollständige Ablösung der Zellen ein, wurde mit einem Silikon-Rubber die verbleibende Zellschicht abgestoßen. Um größere Zellklumpen aufzulösen, wurde mittels einer Pipette mit aufgesetztem Gummiball (Volac) wiederholt die Zell-STV-Suspension angesaugt und kräftig gegen die Wand der Kulturflasche geblasen. Dann wurden die Zellkulturen im Verhältnis 1:10 geteilt, mit neuem Nährmedium versehen und im geschlossenen System bei 37°C inkubiert.

3.1.1.3 Versuchsanordnung

Bei der Cytopathogenitätsprüfung der vier SEB-Präparationen wurden die Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420 und RK-13 verwendet, bei SEB II wurde die HeLa-Zell-Linie, bei SEB IIS die BHK-21-Zell-Linie zusätzlich herangezogen. Der Versuchsansatz geschah in folgender Art und Weise: Eine definierte Menge der beim Teilen der dichtgewachsenen Zellkulturen erhaltenen Zell-STV-Suspension wurde in einen vorbereiteten Erlenmeyerkolben mit dem entsprechenden Nährmedium pipettiert, so daß sich eine Zellkonzentration von ca. 150 000 Zellen/ml Medium ergab. Nach guter Durchmischung wurden je 1,35 ml des zellhaltigen Nährmediums in Kunststoffteströhrchen mit abgeflachtem Boden (Nunc) gegeben. Das zu prüfende SEB wurde entweder sofort zugesetzt oder erst nach dem Dichtwachsen der Zellkultur, wobei dem Zusatz dann noch ein Wechsel des Nährmediums vorherging. Die SEB-Präparationen wurden mit sterilem PBS (pH 7,5) - siehe MAYR et al. (1974) - aufgelöst und so verdünnt, daß Konzentrationen von 2; 1; 0,5 bzw. 0,25 mg SEB/ml erhalten wurden. Beim SEB I wurden zusätzlich Konzentrationen von 0,12 bzw. 0,06 mg SEB/ml, beim SEB III von 4 mg SEB/ml hergestellt. Von diesen SEB-Lösungen wurden nun jeweils 0,15 ml zu dem in den Teströhrchen vorgelegten Nährmedium (1,35 ml) gegeben, so daß sich Toxinkonzentrationen von 400, 200, 100, 50, 25, 12 bzw. 6 mcg/ml Medium ergaben. Für jede dieser Toxinkonzentrationen wurden zwei bzw. drei Teströhrchen verwendet; als Kontrolle wurden drei Teströhrchen mitgeführt, bei denen dem Medium statt der Toxinlösung jeweils 0,15 ml PBS (pH 7,5) zugesetzt worden waren.

Die beschickten Teströhrchen wurden dann im geschlossenen System bei 37°C bebrütet und täglich mittels eines Umkehrmikroskops (Leitz-Diavert) sieben Tage lang bei 40,63 bzw. 100-facher Vergrößerung auf evtl. auftretende cytopathogene Effekte (CPE) hin kontrolliert. Als CPE wurden Veränderungen der Zellmorphologie gewertet, wie Vakuolisation, Granulation, Retraktion der Zellfortsätze, Abkuglung der Zellen, teilweise oder vollständige Hemmung der Zellvermehrung, Ablösung

einzelner Zellen oder Zellverbände sowie Vorkommen von freischwimmenden Zellen im Nährmedium. Diese Veränderungen wurden jeweils im Vergleich zu den mitgeführten Kontroll-Teströhrchen beurteilt. Als positive Reaktion einer SEB-Konzentration wurde nur das Auftreten von CPE in beiden bzw. in mindestens zwei von drei Teströhrchen bewertet.

Zur besseren und genaueren Erkennung und im Hinblick auf eine Dokumentation evtl. vorhandener CPE wurde außerdem bei der Zell-Linie RK-13 bei einer Toxinkonzentration von 200 mcg SEB/ml sowie bei Kontroll-Teströhrchen eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung des Zellraus vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Zellkulturen unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert, allerdings in Leighton-Röhrchen (Bellco) mit Glas-Deckgläschen (10,5 x 50 mm), die mit nicht-toxischen Silikonstopfen verschlossen wurden. Diese Leighton-Röhrchen wurden, um evtl. cytotoxische Substanzen des Glasmaterials zu eliminieren, nacheinander mit 1 n Salzsäure, Reinigungsmittel (7 X-Flow) und Aqua dest. gereinigt. Vor der Verwendung im Versuchsansatz wurden die Leighton-Röhrchen mit den Stopfen sterilisiert (200°C für 3 Std.). Die HE-Färbung wurde entsprechend den Angaben von MAYR et al. (1974) durchgeführt. Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte mit einem Zeiss-Mikroskop bei 100-, 400- und 1000-facher Vergrößerung.

3.1.2 Ergebnisse

Bei der Prüfung der SEB I-Präparation auf Cytopathogenität wurden bei sofortigem Toxinzusatz zu den Zellkulturen folgende Ergebnisse erzielt (Beurteilung im Umkehrmikroskop): Bereits 24 Std. nach Zugabe des SEB I in das zellhaltige Medium wurden sehr ausgeprägte cytopathogene Effekte (CPE) gesehen. Sie bestanden im Auftreten von Granulationen im Zytoplasma der Zellkulturen, wobei sich die Größe und Zahl der zytoplasmatischen Granula als dosisabhängig erwies. Dabei traten diese CPE bei den untersuchten Zellkulturen 75SD-G-376, 75SD-G-420 und RK-13 bereits bei einer SEB-Konzentration von 25 mcg/ml Medium auf.

Nach drei Tagen zeigten sich bei diesen Zellkulturen sogar bei einer Konzentration von 12 und 6 mcg/ml Medium Granulationen im Zytoplasma. Ab dem vierten Inkubationstag kam es dann bei allen Konzentrationen zur Retraktion der Zellfortsätze, Auftreten von abgerundeten, toten Zellen im Zellrasen und schließlich ab dem sechsten Tag zur Ablösung der abgestorbenen Zellen vom Kulturgefäß (s. Bild 1 und 2). Die Ausbildung und die zeitliche Folge der angeführten CPE war wiederum von der Konzentration des SEB I im Nährmedium abhängig, d.h. hohe SEB I-Konzentrationen führten zu beschleunigten und größeren CPE als niedrigere Konzentrationen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Cytopathogenität von SEB I und SEB III bei RK-13-Zellkulturen

Inkubationszeit (Tage)	SEB I (mcg/ml)						SEB III (mcg/ml)				
	200	100	50	25	12	6	400	200	100	50	25
1	++	+	+	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø
2	++	+	+	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø
3	+++	++	+	+	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø
4	+++	++	++	+	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø
5	+++	+++	++	++	++	+	+	+	Ø	Ø	Ø
6	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	Ø	Ø	Ø
7	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	Ø	Ø	Ø

Die parallel durchgeführten HE-Färbungen des Zellrasens erbrachten bei der mit 200 mcg SEB I/ml Medium inkubierten RK-13-Zelllinie (bei sofortigem Toxinzusatz) im Vergleich zu den Kontrollprä-

paraten (ohne SEB Zusatz) folgende Ergebnisse: Nach 24-stündiger Bebrütung war die Zahl der abgekugelten Zellen mit relativ kleinem Kern und geringer Ausbildung des Zytoplasmas erhöht, teilweise war eine Schrumpfung oder Zertrümmerung von Zellkernen festzustellen. Nach zweitägiger Inkubationsdauer war die Zahl der am Deckgläschen festsitzenden Zellen gegenüber dem Kontrollpräparat deutlich geringer; in nahezu allen Zellen war eine große Zahl von Granula und Vakuolen (vor allem am Zellrand) zu sehen. In den mit SEB I beschickten Zellkulturen waren im Vergleich zu den Kontroll-Zellkulturen mit ihren zahlreichen Zellteilungsvorgängen nahezu keine Mitosen zu erkennen. Diese Ausprägung der CPE hatte sich auch nach dreitägiger Inkubationsdauer nicht verändert. Vier Tage nach Inkubationsbeginn waren bei der geringen Zahl an festsitzenden Zellen starke Zellschädigungen festzustellen: Vakuolenbildung im Zytoplasma, zahlreiche Kernzertrümmerungen und -pyknosen. Nach siebentägiger Bebrütung waren nur noch vereinzelt Zellen mit stark degeneriertem Aussehen auf dem Deckgläschen zu finden.

Bei der Prüfung der SEB II-Präparation (Umkehrmikroskop) waren auch bereits nach 24 Std. bei den eingesetzten Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420, RK-13 und HeLa deutliche CPE festzustellen. Diese äußerten sich - wie bei SEB I - im Auftreten von Granulationen im Zytoplasma der Zellen, allerdings nur nach Zugabe von mindestens 100 mcg SEB II/ml Medium. Zahl und Größe der Granulationen waren außerdem im Vergleich zu den bei Verwendung von SEB I beobachteten Granulationen deutlich verringert (bei gleicher SEB-Konzentration). Parallel dazu traten in den ersten drei Tagen zunehmend im Medium schwimmende tote Zellen sowie am Kulturgefäß festsitzende abgekugelte Zellen auf. Am dritten Inkubationstag zeigten sich auch bei niedrigeren geprüften SEB II-Konzentrationen Granulationen, die allerdings bei 25 mcg SEB II/ml Medium nicht sehr ausgeprägt waren. Nach fünf bis sieben Tagen Bebrütungs-dauer kam es dann vor allem bei den höheren SEB II-Konzentrationen (200 und 100 mcg/ml) zum Verkürzen der Zellfortsätze und zur Schrump-

fung des Zytoplasmas (s. Bild 1 und 3). Gleichzeitig lösten sich immer mehr Zellen bzw. Zellverbände aus dem Zellrasen. Die parallel durchgeführte HE-Färbung (RK-13-Zell-Linie) ergab folgende Veränderungen (bei einer SEB II-Konzentration von 200 mcg/ml Medium): Nach einem Tag Inkubationszeit konnten nur geringe Veränderungen im Vergleich zu den Kontroll-Präparaten (ohne SEB II-Zusatz) beobachtet werden. Insbesondere erschien die Zellvermehrung nicht gehemmt zu sein. Nach zweitägiger Bebrütungszeit war die Vermehrung der Zellen etwas vermindert. Außerdem war zu diesem Zeitpunkt zum erstenmal eine zahlenmäßig größere Ablösung von einzelnen Zellen aus dem Zellrasen zu erkennen. Bei vielen Zellen konnten darüber hinaus Granulationen und Vakuolisierungen gesehen werden. Nach dreitägiger Inkubationszeit schien eine gewisse "Erholung" der Zellen eingetreten zu sein; die Zahl der am Deckgläschen festsitzenden Zellen war im Vergleich zur Kontroll-Zellkultur nur mehr geringfügig vermindert. Trotzdem waren wiederum zahlreiche Granula und Vakuolen erkennbar, darüber hinaus konnte ein erhöhtes Vorkommen von Schädigungen des Zellkerns (Pyknose, Zertrümmerung) beobachtet werden. In den folgenden vier Inkubationstagen änderte sich dieses Bild nicht wesentlich. Lediglich die Zahl der abgelösten Zellen aus dem Zellrasen stieg an. Die bei der SEB I-Präparation aufgetretene nahezu vollständige Ablösung der Zellen vom Deckgläschen konnte bei der SEB II-Präparation auch nach siebentägiger Bebrütung nicht festgestellt werden.

Bei der Verwendung von SEB IIS konnten CPE bei den Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420, RK-13 und BHK-21 erstmals nach zweitägiger Inkubationszeit bei Konzentrationen von 200 und 100 mcg SEB/ml Medium erzielt werden; sie bestanden dabei im Auftreten von Granulationen, von freischwimmenden Zellen im Nährmedium sowie von Abrundungen der am Boden des Kulturgefäßes festsitzenden Zellen. Nach drei Tagen Inkubationsdauer traten auch bei einer SEB-Konzentration von 50 und 25 mcg/ml Zellschädigungen auf, wobei sich gleichzeitig die CPE bei den höheren Toxinkonzentrationen verstärkt hatten. Ab

dem fünften Inkubationstag kam es dann bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes zunehmend zur Ablösung von größeren Zellverbänden (in erster Linie bei 200 und 100 mcg SEB IIS/ml. Eine HE-Färbung wurde im Fall des SEB IIS nicht durchgeführt.

Bei der Testung des am höchsten gereinigten SEB, der SEB III-Präparation, zeigte es sich, daß bei den untersuchten Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420 und RK-13 bei Konzentrationen von 100, 50 bzw. 25 mcg SEB III/ml Medium während der gesamten Inkubationszeit (Tabelle 6) keine CPE zu beobachten waren (Umkehrmikroskop) (s. Bild 1 und 4). Bei einer Konzentration von 400 und 200 mcg/ml war während der siebentägigen Inkubationszeit eine, im Vergleich zur Kontroll-Zellkultur, geringfügig angestiegene Zahl von freischwimmenden Zellen im Nährmedium zu registrieren. Die für die anderen SEB-Präparationen typischen Granulationen im Zytoplasma sowie andere CPE wie Wachstumshemmung, Zellretraktion und Ablösung von Zellverbänden fehlten bei allen SEB III-Konzentrationen während der gesamten Inkubationsdauer. Erst nach längerer Bebrütungszeit (mehr als sieben Tage) entstand der Eindruck, daß im Vergleich zur Kontroll-Zellkultur ein verstärkter Degenerationsprozeß einsetzte (größere Zahl von toten Zellen im Medium). Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß auch bei den Kontroll-Zellkulturen zu diesem Zeitpunkt infolge Nährstoffmangel, pH-Wert-Erniedrigung usw. eine, wenn auch weniger deutlich ausgeprägte, Degeneration einsetzte.

Die Auswertung der HE-Färbungen von RK-13-Zellkulturen, die mit SEB III (200 mcg/ml) über einen Zeitraum von sieben Tagen inkubiert worden waren, zeigten ebenfalls nur geringe Veränderungen. Es traten erstmals nach drei Inkubationstagen und dann andauernd bis zum siebten Tag vereinzelte Löcher im Zellrasen auf, was auf eine Ablösung von abgestorbenen Zellen hindeutet. Ansonsten wurden weder die bei den anderen SEB-Präparationen beobachteten CPE (wie Vakuolen- und Granulabildung, Wachstumshemmung, Kernschädigung) noch Zellretraktion und Ablösung von Zellverbänden gesehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit zunehmender Reinigung

des SEB eine deutliche Reduzierung der CPE beobachtet werden konnte (Tabellen 5 und 6). Dabei zeigte SEB I die mit Abstand größte cytopathogene Wirkung, während SEB II und SEB IIS eine bereits deutlich reduzierte zellschädigende Wirkung hatten. Dagegen konnten bei SEB III erst bei relativ hohen Toxinkonzentrationen CPE, und zwar nur verhältnismäßig geringe, registriert werden.

Tabelle 6: Cytopathogenität von SEB-Präparationen unterschiedlichen Reinheitsgrads (25 mcg/ml) bei RK-13-Zellkulturen

Inkubationszeit (Tage)	SEB I	SEB II	SEB IIS	SEB III
1	+	∅	∅	∅
2	+	∅	∅	∅
3	+	+	+	∅
4	+	+	+	∅
5	++	-	+	∅
6	++	++	++	∅
7	+++	++	++	∅

Bei den getesteten Zellkulturlinien konnten keine signifikanten Unterschiede untereinander in der Nachweisempfindlichkeit bei den einzelnen SEB-Präparationen festgestellt werden. Auch beim Vergleich der beiden Versuchsbedingungen - sofortiger Toxinzusatz bzw. Toxinzusatz nach Dichtwachsen der Zellen und nach Mediumwechsel - konnte kein wesentlicher Unterschied gesehen werden, so daß auch auf eine nähere Beschreibung der Ergebnisse bei letztgenannter Versuchsanordnung im vorstehenden Abschnitt verzichtet wurde. Dem sofortigen Toxinzusatz ist aber der Vorzug zu geben, da er eine schnellere und weniger arbeitsaufwendige Versuchsdurchführung erlaubt.

Aufnahmen der Zellen in situ (Umkehrmikroskop - Teströhrchen mit abgeflachtem Boden)

Objektiv 4-(SEB I), 6,3-(SEB III, Kontrolle) bzw. 10-(SEB II)fach vergrößernd. Inkubationszeit jeweils 5 Tage.

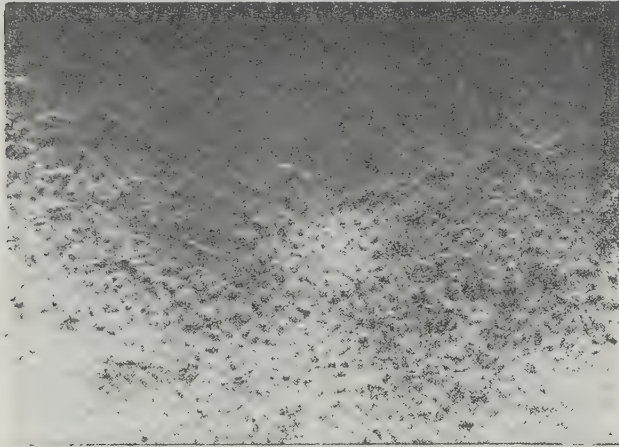


Bild 1: Zellkultur RK-13 Kontrolle (ohne Toxinzusatz)

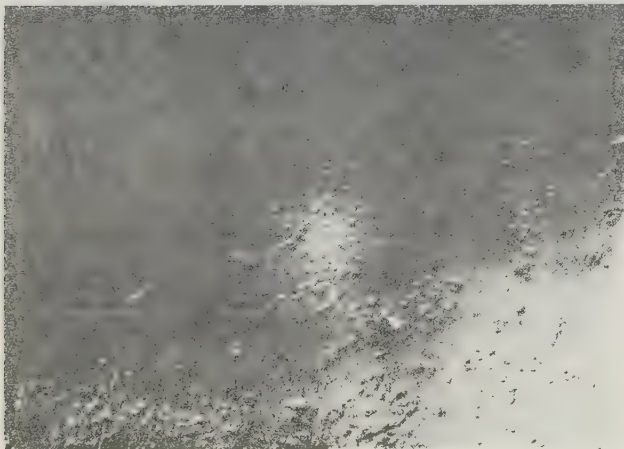


Bild 2: Zellkultur RK-13 (200 mcg SEB I/ml Medium)



Bild 3: Zellkultur RK-13 (200 mcg SEB II/ml Medium)



Bild 4: Zellkultur RK-13 (200 mcg SEB III/ml Medium)

Durch die HE-Färbung konnten nur geringe zusätzliche Informationen über die SEB-Wirkung erhalten werden, so daß auf ihre Verwendung außer bei speziellen Fragestellungen in der Regel verzichtet werden kann.

3.2 Nachweis von SEB in Zellkulturen mittels direkter Fluoreszenztechnik

3.2.1 Markierung von SEB mit FITC

3.2.1.1 Material und Methodik

Eine unabdingbare Voraussetzung für den Nachweis eines Antigens in einem Gewebe ist die Markierung des Antigens oder seines Antikörpers. Dabei ist die Verwendung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) zur Markierung eine der gebräuchlichsten Arbeitsmethoden. FITC-markiertes SEB bzw. SEB-Antikörper wurden bisher für Studien der SEB-Verteilung und Lokalisation bei verschiedenen Versuchstieren eingesetzt (NORMANN, JAEGER und JOHNSEY, 1969; NORMANN, 1971; NORMANN und STONE, 1972). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher geprüft werden, ob FITC-markiertes SEB auch in Zellkulturen nachgewiesen werden kann.

Die Markierung von SEB mit FITC erfolgte in Anlehnung an die von NORMANN, JAEGER und JOHNSEY (1969) bzw. MAYR et al. (1977) angegebene Methodik. Zu diesem Zweck wurden 15 mg SEB-Lyophilisat (SEB III) in 3 ml eines 0,5 M Karbonat-Bikarbonatpuffers (pH 8,6) sowie 0,4 mg FITC-Isomer I (Serva) in 2 ml dieses Puffers gelöst. Zur SEB-Lösung wurde dann unter ständigem Rühren (Magnetrührer) die FITC-Lösung tropfenweise über einen Zeitraum von 10 Min. zugegeben (Farbstoff-Protein-Verhältnis 1 : 37,5). Der pH-Wert des SEB-FITC-Rohkonjugats wurde mittels Mikroelektrode kontrolliert und durch Zugabe von 0,25 ml einer 0,1 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung auf pH 8,6 einreguliert. Das SEB-FITC-Rohkonjugat wurde dann bei Raumtemperatur für vier Std. gerührt; anschließend wurde der nicht gebundene Farbstoff durch Gelfiltration (Sephadex G 50 fine) vom markierten Toxin getrennt. Die Herstellung der Sephadex G 50-Säule erfolgte in Anlehnung an die von MAYR et al. (1977)

angegebene Methode. Dazu wurde Sephadex G 50 fine (Pharmacia) in 0,1 M NaCl -Phosphatpuffer (pH 7,2) suspendiert und über Nacht zum Quellen gebracht. Danach wurde die Säule (2,8x30 cm) gepackt und mit dem o.a. Puffer gespült (dreifaches Säulenvolumen). Anschließend wurde das SEB-FITC-Rohkonjugat auf die Gelsäule gebracht und eluiert (45 cm Arbeitsdruck). Es erfolgte eine deutliche Trennung in eine schnell wandernde Bande (FITC-markiertes SEB) und in eine langsam wandernde zweite Bande (nicht gebundener Farbstoff). Die Eluate wurden in 10 ml-Portionen aufgefangen und die Extinktionswerte bei 495 nm (Absorptionsmaximum des FITC) und bei 277 nm (Absorptionsmaximum des SEB) gemessen. Die FITC-markiertes SEB (SEB-FITC) enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und über eine UM2-Membran mittels Ultrafiltration (Amicon) konzentriert. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration des SEB-FITC mit einem Einmalfilter (Millipore) und die Lagerung bei -20°C bis zur Verwendung in den Zellkulturversuchen (Abschnitt 3.2.2).

Zur Überprüfung der erfolgten Abtrennung des nicht gebundenen FITC wurde eine Dünnschichtchromatographie vorgenommen. Für die Markierung verwendetes FITC, unmarkiertes SEB und FITC-markiertes SEB (nach Gelfiltration) wurden auf eine Kieselgel-Fertigplatte (Merck-Kieselgel 60) aufgetragen und mit einem Laufmittel aus 50 % Methanol und 50 % Wasser aufgetrennt. Die aufgetrennten Proben wurden dann mittels einer UV-Lampe auf das Vorhandensein von fluoreszierendem Farbstoff geprüft.

Weiterhin wurden serologische Aktivität, SEB-Gehalt und FITC-Gehalt des SEB-FITC-Konjugats nach Gelfiltration und Konzentrierung bestimmt. Die Feststellung der serologischen Aktivität wurde mit der im Abschnitt 3.1.1.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Der SEB-Gehalt wurde außerdem anhand des Extinktionswertes bei 277 nm und des von SCHANTZ et al. (1965) angegebenen Wertes für eine 1%ige SEB-Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 14,4$) berechnet. Für die Ermittlung der FITC-Konzentration im Konjugat wurde eine Eichkurve mittels FITC-Lösungen verschiedener Konzentrationen erstellt (MAYR et al., 1977). Dazu

wurden 1 mg FITC-Isomer I (Serva) in 50 ml eines 0,01 M NaCl-Phosphatpuffers (NaCl 0,15 M) - pH 7,2 - gelöst und davon mit dem gleichen Puffer Verdünnungen angelegt, so daß Lösungen mit FITC-Konzentrationen von 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 1,0, 0,5, 0,25 und 0,125 mcg/ml zur Verfügung standen. Die bei 495 nm gemessenen Extinktionswerte wurden mit den dazugehörigen FITC-Konzentrationen in ein Ordinatensystem eingetragen. Diese Eichkurve (Abbildung 3) erlaubt die Bestimmung der FITC-Konzentration im FITC-Konjugat (SEB-FITC). Außerdem wurden die Extinktionswerte in Betracht kommender FITC-Konzentrationen (10; 5; 2,5 und 1,25 mcg/ml) bei 277 nm bestimmt, um bei der SEB-Gehaltsbestimmung (277 nm) der Konjugate die wegen der Absorption des FITC bei dieser Wellenlänge notwendige Korrektur der Extinktionswerte durchführen zu können (Abbildung 4).

Zusätzlich erfolgte die Herstellung eines Absorptionsspektrums des SEB-FITC-Konjugats im Wellenlängenbereich von 260-560 nm (Beckman-Spektrophotometer mit Scanning-Einrichtung).

Abbildung 3: Eichkurve zur Bestimmung der FITC-Konzentration

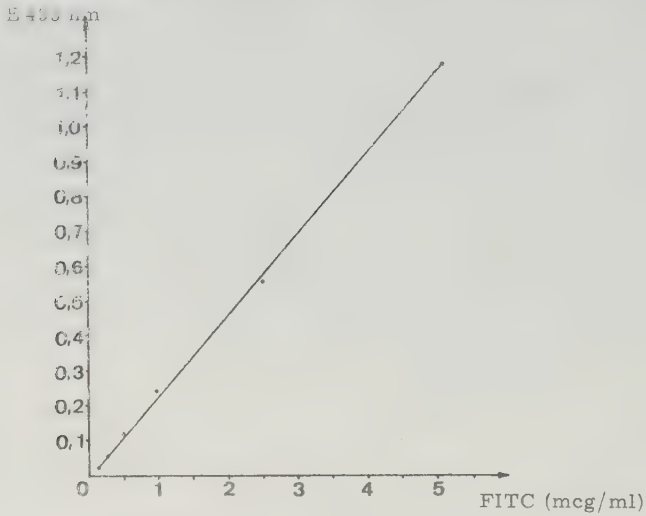
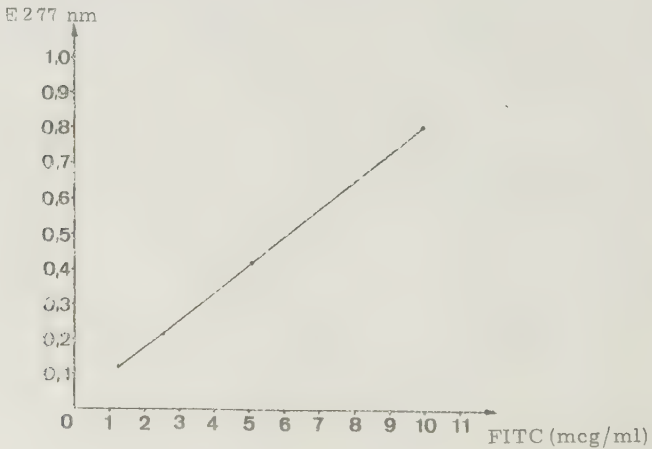


Abbildung 4: Eichkurve für die Korrektur des Extinktionswerts von SEB-FITC bei 277 nm zur Berechnung des spektrophotometrisch bestimmten SEB-Gehaltes



3.2.1.2 Ergebnisse

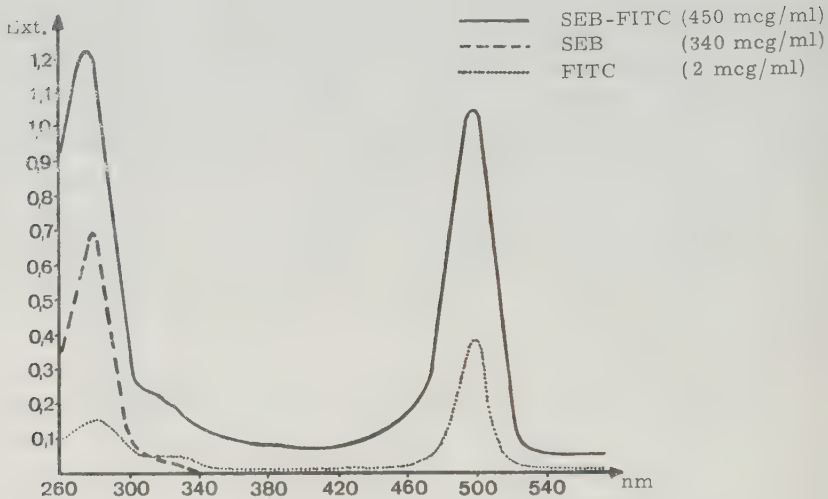
Die Ergebnisse der am nativen SEB und am SEB-FITC-Konjugat nach Gelfiltration und Konzentration durchgeführten Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß das SEB-FITC-Konjugat (nach Gelfiltration und Konzentration) eine serologische Aktivität von 450 mcg/ml und eine FITC-Konzentration von 4,5 mcg/ml hatte. Die im Laufe der Kopplung von FITC an SEB aufgetretene SEB-Verlustrate betrug unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Gesamtvolumina ca. 28 % (berechnet nach dem serologischen SEB-Gehalt und dem SEB-Gehalt (277 nm)). Diese ist durch die beiden Arbeitsschritte Gelfiltration und Konzentration mit den dabei unvermeidlich auftretenden Verlusten bedingt.

Aus den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie konnte gefolgert werden, daß durch die Gelfiltration das nicht gebundene FITC aus dem SEB-FITC-Rohkonjugat vollständig abgetrennt wurde und kein freies FITC im FITC-markierten SEB vorhanden ist. Auch das vom SEB-FITC angelegte Absorptionsspektrum belegt die erfolgreiche Markierung von SEB mit FITC. Es weist einen vom FITC verursachten Peak bei einer Wellenlänge von etwa 495 nm sowie den für SEB charakteristischen Peak bei 277 nm auf (Abbildung 5).

Tabelle 7: Charakteristika von SEB und FITC-markiertem SEB (SEB-FITC)

Eigenschaft	SEB	SEB-FITC nach Gelfiltration u. Konzentr.
SEB-Gehalt (serologisch) (mg/ml)	3,5	0,45
SEB-Gehalt (277 nm) (mg/ml)	4,6	0,59
FITC-Gehalt (mcg/ml)	./.	4,5
SEB-Lyophilisat-Einwaage (mg/ml)	5	./.
Menge (ml)	3	17

Abbildung 5: Absorptionsspektren von SEB, FITC und SEB-FITC



3.2.2 Zellkulturversuche mit FITC-markiertem SEB

3.2.2.1 Material und Methodik

Für diese Versuche wurden die Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420 und RK-13 verwendet, da sie problemlos über längere Zeit kultivierbar sind und aufgrund einer ziemlich hohen Wachstumsgeschwindigkeit, vor allem bei 75SD-G-420, eine größere Anzahl von Versuchsansätzen innerhalb kurzer Zeit erlauben.

Der Versuchsansatz erfolgte in ähnlicher Weise wie im Abschnitt 3.1.1.3 für die Prüfung der verschiedenen SEB-Präparationen auf ihre Cytopathogenität. Dabei wurden als Kulturgefäße jedoch nur Leighton-Röhrchen (Bellco) mit Deckgläschen (10, 5 x 50 mm) verwendet, die mit nicht-toxischen Silikonstopfen verschlossen wurden.

Für die eigentliche Durchführung des Zellkulturversuchs wurde eine

Stamm-Zellkultur mittels STV-Lösung abgelöst; ein Teil der abgelösten Zellen wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt, so daß eine Zellkonzentration von ca. 100 000 Zellen/ml Medium erreicht wurde. Je 2 ml dieses zellhaltigen Nährmediums wurden in Leighton-Röhrchen pipetiert. Bei dem in diesen Versuchen verwandten SEB-FITC handelte es sich um die im Abschnitt 3.2.1.2 (Tabelle 7) beschriebene SEB-FITC-Präparation mit einer SEB-Konzentration von 450 mcg/ml (serologische Aktivität). Von diesem SEB-FITC wurden unterschiedliche Mengen zu den vorgelegten 2 ml des Mediums zugegeben, so daß Konzentrationen von 40 bis 1 mcg SEB-FITC pro ml Medium vorlagen. Als Kontrollen dienten Leighton-Röhrchen mit 2 ml des zellhaltigen Mediums, denen 0,2 ml PBS (pH 7,5) bzw. 10 mcg FITC (steril) zugesetzt worden waren. Die Inkubation der Zellkulturen mit dem SEB-FITC wurde für eine Dauer von 2-3 Tagen vorgenommen; darauf folgte das nachfolgend beschriebene Fixationsverfahren.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt das SEB-FITC nach seinem Zusatz zur Zellkultur erstmalig nachzuweisen war. Dazu wurde nach dem Dichtwachsen der Zellkultur und nach Mediumwechsel das SEB-FITC (40 mcg/ml Medium) zugesetzt und die Bebrütung fortgeführt. Nach unterschiedlich langer Zeitdauer (5, 10, 15, 30, 60 und 120 Min.) wurde dann die Inkubation beendet und das nachstehend beschriebene Fixationsverfahren durchgeführt.

Zur Herstellung von Präparaten für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurde nach beendeter Inkubation ein Deckgläschen aus den Leighton-Röhrchen entnommen und für 10 Min. in PBS (pH 7,5) (dreimaliger Wechsel) zur Entfernung des Nährmediums gewaschen. Darauf folgte die Fixation der Zellen, die alternativ mit verschiedenen Fixierungsmitteln (Aceton, Methanol und Isopropylalkohol) für einen Zeitraum von 15 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Nach der Fixation wurden die Präparate für 30 Min. bei Raumtemperatur getrocknet und mit einem Einbettungsmittel (Glycerin und Karbonat-Bikarbonat-

Puffer-pH 9,5 - im Verhältnis 9:1 gemischt) auf gereinigte, fettfreie Objektträger aufgelegt (MAYR et al., 1977). Bei einem Teil der Präparate (mit SEB-FITC inkubierte als auch Kontroll-Zellkulturen) wurde keine Fixation durchgeführt; diese Präparate wurden nach dem Waschen mit PBS (pH 7,5) sofort mit dem Einbettungsmittel auf Objektträgern eingebettet. Die Betrachtung der Präparate erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Universal mit Hg-Höchstdrucklampe HBO 200 W/4) mit Auflichteinrichtung (Auflichtkondensor III RS).

3.2.2.2 Ergebnisse

Als Ergebnis dieser Versuchsreihe kann zusammengefaßt werden, daß sowohl bei unfixierten als auch bei fixierten Zellkulturpräparaten, die mit SEB-FITC inkubiert worden waren, ein Auftreten von fluoreszierenden Partikeln im Zytoplasma feststellbar war (s. Bild 5 und 6).

Dabei erwies sich die Verwendung von Methanol als Fixierungsmittel als die vorteilhafteste Methode, da sie die brillianteste Fluoreszenz gab. Mit den anderen geprüften Fixierungsmitteln Aceton und Isopropylalkohol war die Fluoreszenzintensität wesentlich geringer. Bei der Betrachtung der Kontrollpräparate konnte keine Fluoreszenz registriert werden. Bemerkenswert ist, daß freies FITC (Kontrolle) im Nährmedium von den Zellen nicht aufgenommen wurde.

Der Nachweis von intrazellulärem SEB-FITC war sowohl bei den Zellkulturen, denen das SEB-FITC sofort bei Aussaat der Zellen zugesetzt worden war, möglich, als auch bei Zellkulturen, bei denen das SEB-FITC erst nach Dichtwachsen und Mediumwechsel zugegeben worden war. Fluoreszierende intrazelluläre Partikel waren bis zu einer Konzentration von mindestens 16 mcg SEB-FITC/ml Medium zu erkennen.

Der früheste Zeitpunkt, zu dem das SEB-FITC in der Zellkultur intrazellulär nachweisbar war, wurde mit 15 Min. (nach Zusatz des SEB-FITC zum Nährmedium) gefunden. Es traten vereinzelte fluoreszierende Punkte in einzelnen Zellen auf. Mit zunehmender Inkubationsdauer

Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop (mit Auflichteinrichtung)

Direkte Fluoreszenztechnik (Inkubation der Zellkultur mit 40 mcg SEB-FITC/ml Medium für drei Tage - Methanolfixation)

Objektiv 40fach (Bild 5) bzw. 100fach (Bild 6) vergrößernd

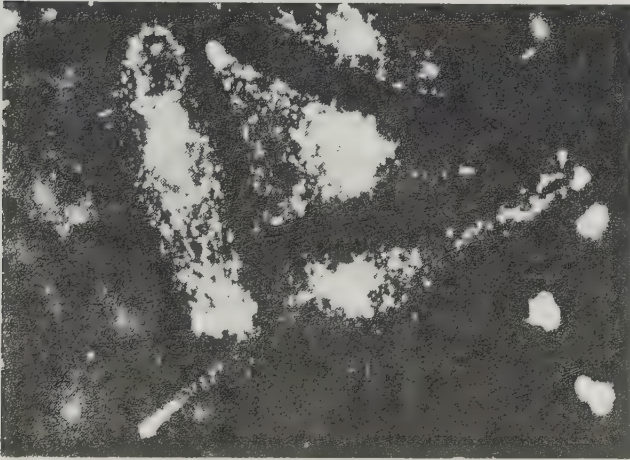


Bild 5: Zellkultur 75SD-G-376 - direkte Fluoreszenztechnik

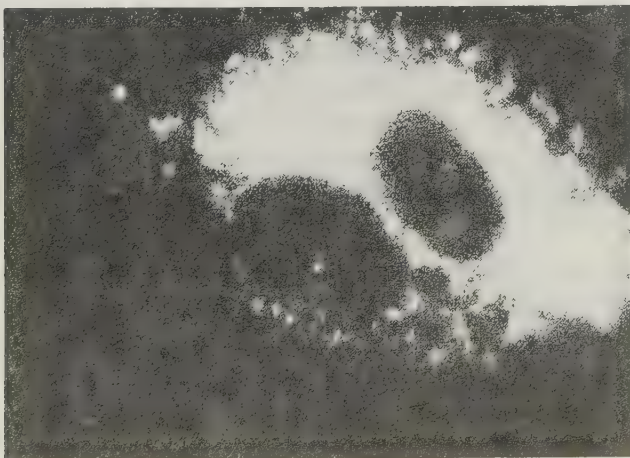


Bild 6: Zellkultur 75SD-G-376 - direkte Fluoreszenztechnik

stieg das Vorkommen der intrazellulären Fluoreszenz stetig an, so daß sie nach ca. 2 Std. derjenigen nach 2- bis 3-tägiger Inkubation glich.

3.3. Nachweis von SEB in Zellkulturen mittels Immunofluoreszenztechnik

3.3.1 Markierung von SEB-Antikörpern mit FITC

Die Lokalisation eines Antigens mit Hilfe seines Antikörpers, der mit einem geeigneten Fluorochrom markiert worden ist, stellt eine der am häufigsten angewandten Methoden der Immunofluoreszenztechnik dar. Sie besitzt zwar im Vergleich zur direkten Fluoreszenztechnik den Nachteil, daß erst ein spezifisches Antiserum hergestellt werden muß, hat aber andererseits den Vorteil einer größeren Nachweisempfindlichkeit (NAIRN, 1969). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher geprüft werden, ob der Nachweis von SEB durch FITC-markierte SEB-Antikörper auch in Zellkulturen möglich ist.

3.3.1.1 Material und Methodik

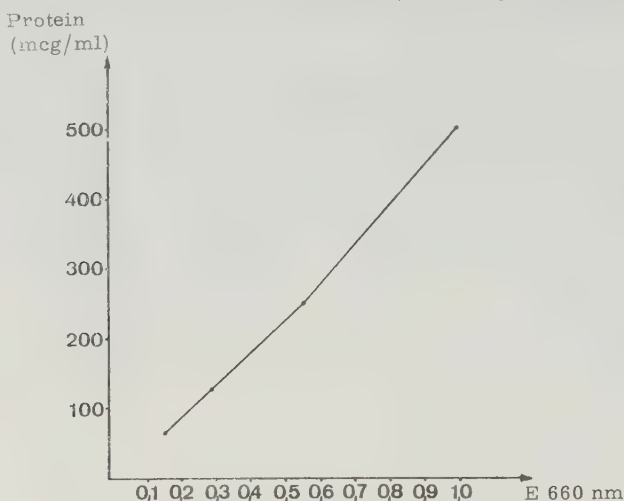
Zur Markierung von SEB-Antiserum (SEB-AS) mit FITC wurde ein am Institut produziertes Antiserum, das nach Immunisierung von Kaninchen mit SEB gewonnen wurde, verwendet. Die Immunisierung erfolgte durch subcutane Applikation von mit Formaldehyd inaktiviertem SEB III (siehe 3.1.1.1), dem Aluminiumhydroxid zugesetzt worden war. Das gewonnene Antiserum wurde mittels Natrium- oder Ammoniumsulfatfällung präzipitiert, rekonstituiert, sterilfiltriert und in geeigneten Ampullen lyophilisiert. Die Lagerung der Anti-SEB- γ -Globuline erfolgte bei -20°C . Vor der Markierung mit FITC wurde jeweils eine Ampulle mit Anti-SEB- γ -Globulin-Lyophilisat mit 1 ml PBS (pH 7,5) rekonstituiert und zur Entfernung der Sulfat-Ionen gegen NaCl-Phosphatpuffer (pH 7,2; MAYR et al., 1977) bis zu drei Tage lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ dialysiert. Das Dialysat wurde täglich zwei bis drei Mal gewechselt. Die Prüfung auf vollständige Entfernung der Sulfat-Ionen, die auch für eine optimale FITC-Markierung notwendig ist, erfolgte durch Zugabe von einigen Tropfen einer

gesättigten Bariumchloridlösung zu ca. 10 ml zuvor mit HCl angesäuertem Dialysat (MAYR et al., 1977).

Nach abgeschlossener Dialyse wurde eine Proteingehalts- und Antikörpertiterbestimmung der Sulfat-freien Anti-SEB- γ -Globulin-Lösung durchgeführt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit der von BERGMEYER (1974) angegebenen Methode nach LOWRY. Dazu wurden zunächst zwei Stammlösungen (Lösung 1 und 2) hergestellt, aus denen jeweils erst kurz vor Versuchsbeginn durch die Mischung von 50 Volumenteilen der Lösung 1 (2 g Na_2CO_3 , wasserfrei, und 20 mg Na-K-Tartrat mit 0,1 n NaOH ad 100 ml lösen) und 1 Volumenteil der Lösung 2 (50 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ mit Aqua dest. ad 10 ml lösen) die Gebrauchslösung 3 hergestellt wurde. Zur Proteingehaltsbestimmung wurde 1 ml der Probe mit 5 ml der Lösung 3 gemischt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 0,5 ml der Lösung 4 (5 Teile Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck) mit 9 Teilen Aqua dest. mischen) zugegeben, gemischt und weitere 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert wurde 1 ml Aqua dest. anstatt der Probe eingesetzt; als Standardprotein diente bovines Serumalbumin (Behring-Werke), von dem Konzentrationen von 62,5, 125, 250 bzw. 500 mcg/ml im gleichen Versuchsansatz mitliefen. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Extinktionen der Probe sowie der Standardproteine gegen die Extinktion des Leerwerts bei einer Wellenlänge von 660 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer gemessen. Es wurde eine Eichkurve aus den Extinktionen der Standardwerte in Beziehung zu den eingesetzten Proteinkonzentrationen erstellt. Der Proteingehalt der Globulin-Lösung, der sich dann aus der Eichkurve (Abbildung 6) ablesen ließ, belief sich auf 17,5 mg/ml.

Die Bestimmung des Antikörpertiters wurde mittels der radialen Doppel-diffusion nach OUCHTERLONY durchgeführt. Dazu wurde ein entfetteter Objektträger (76 x 26 mm), der in einem Plastikrahmen (Camag-System) auf einem Nivelliertisch befestigt war, mit 3 ml einer 1%igen Agarose (gelöst in 0,02 M Barbitallpuffer, pH 8,4) beschichtet. Nach dem Erstar-

Abbildung 6: Eichkurve zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels der Methode nach LOWRY (Referenzprotein: BSA)



ren der Gelschicht wurden mehrmals nebeneinander je fünf Löcher von 3 mm Durchmesser ausgestanzt. Im allgemeinen erfolgte eine ringförmige Anordnung von vier Löchern (ein Depot für das SEB-Referenz-Antiserum bzw. drei Depots für die Anti-SEB- γ -Globulin-Lösungen) um ein zentrales Loch für das Antigen (SEB). Als Referenz-SEB-Antiserum wurde ein am Institut hergestelltes SEB-Antiserum in der Verdünnung 1:40 verwendet, das in diesem Testsystem stets eine deutliche Präzipitationslinie lieferte; als Antigen diente ein von der Fa. Serva bezogenes SEB (Gebrauchsverdünnung 2 mcg/ml). Die zu untersuchende Anti-SEB- γ -Globulin-Lösung wurde in Zweierstufen mit PBS (pH 7,5) verdünnt (1:2 bis 1:512). Es wurden jeweils 7 μ l der entsprechenden Lösungen mit einer Eppendorf-Pipette einpipettiert. Die Inkubation wurde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 24 Std. durchgeführt. Danach erfolgte Trocknung, Färbung und Entfärbung wie bei der einfachen radialen Immunodiffusion (siehe Abschnitt 3.1.1.1). Als Antikörpertiter der Anti-SEB- γ -Globulin-Lösung wurde dann die Verdünnungsstufe

angenommen, die in diesem Test noch eine deutlich erkennbare Präzipitationslinie ergeben hatte. Das war in diesem Falle die Verdünnung 1 : 128.

Die Markierung der SEB-Antikörper mit FITC wurde in Anlehnung an die von MAYR et al. (1977) gegebene Anleitung durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung von FITC-Isomer I (Serva) in der Konzentration von 1 mg/ml in 0,5 M Karbonat-Bikarbonat-Puffer (pH 9,5) hergestellt. Von dieser FITC-Lösung wurden nun 2,3 ml zu 6,7 ml der o.a. Anti-SEB- γ -Globulin-Lösung (Protein-Gesamtmenge 117 mg) langsam unter ständigem Rühren tropfenweise zugegeben. Dabei wurde ein Farbstoff (FITC)/Protein-Verhältnis von 1 : 50 gewählt, d.h. 1 mg FITC pro 50 mg Anti-SEB- γ -Globulin (bestimmt im Test nach LOWRY). Der pH-Wert wurde mittels Mikroelektrode gemessen und blieb konstant bei pH 9,5, so daß eine Korrektur nicht notwendig war. Das FITC/Globulin-Gemisch wurde für 2,5 Std. bei Raumtemperatur gerührt, zur Entfernung der während der Markierung gebildeten Präzipitate zentrifugiert (2200 x g / 20 Min.), und dann zur Abtrennung des nicht gebundenen FITC einer Gelfiltration mit Sephadex G 50 fine in der bei der Herstellung von SEB-FITC (Abschnitt 3.2.1) beschriebenen Art unterzogen. Die dabei erhaltenen 20 ml-Fractionen wurden im Spektralphotometer (Zeiss) bei 495 und 280 nm gemessen, und es wurden dann anhand der Extinktionswerte die das Anti-SEB- γ -Globulin-FITC-Konjugat (SEB-AS-FITC) enthaltenden Fractionen gepoolt.

Zur Isolierung der optimal markierten Globuline wurde die von MAYR et al. (1977) vorgeschlagene Technik der Reinigung von FITC-Konjugaten mit DEAE-Zellulose und stufenweiser Elution durchgeführt. Dazu wurde DEAE-Zellulose (Servacel DEAE 23 SS) mit ca. 1000 ml 0,5 n NaOH dreimal, anschließend mit jeweils ca. 200 ml Aqua dest. siebenmal gewaschen. Der pH-Wert dieser wäßrigen Suspension wurde mit 0,2 M NaH_2PO_4 auf pH 6,3 einreguliert; daraufhin folgte ein dreimaliges Waschen der DEAE-Zellulose mit 0,0175 M Phosphatpuffer (pH 6,3). Der dünnflüssige DEAE-Zellulosebrei wurde in eine Chromatographiesäule (2 x 25 cm) gefüllt und mit 300 ml des 0,0175 M Phosphatpuffers

(pH 6,3) gespült. Das gepoolte SEB-AS-FITC wurde dann tropfenweise auf die Oberfläche der DEAE-Zellulose aufgebracht. Nach dem Eindringen des Konjugats in die DEAE-Zellulose erfolgte die Elution in drei Schritten:

Fraktion I:	0,0175 M Phosphatpuffer (pH 6,3) in Aqua dest.		
Fraktion II:	"	"	in 0,125 M NaCl
Fraktion III:	"	"	in 0,25 M NaCl

Bei jeder Elutionsstufe erschien eine gefärbte Fraktion, die in Portionen zu je ca. 10 ml aufgefangen wurde. Nach Elution der gefärbten Bande erfolgte die Zugabe von Puffer der nächsthöheren Salzkonzentration. Es wurden dann die Extinktionswerte der Eluate bei 280 und 495 nm bestimmt. Anhand dieser Meßwerte wurden dann in den einzelnen Elutionsstufen die Fraktionen mit dem fluoreszierenden Anti-SEB- γ -Globulin ausgewählt und gepoolt. Die gepoolten Fraktionen wurden analog zu den entsprechenden Elutionsstufen mit I, II und III bezeichnet. Diese einzelnen Fraktionen wurden gegen 0,01 M NaCl-Phosphatpuffer (pH 7,2) für 24 Std. bei +4°C dialysiert. Zur Konzentrierung der einzelnen Fraktionen (ca. 30 bis 40 ml) auf etwa 10-20% des ursprünglichen Volumens wurde die Ultrafiltration (Amicon) über eine UM 2-Membran eingeleitet. Die konzentrierten Fraktionen wurden dann in Portionen von 1 ml in Gefrierampullen (Nunc) abgefüllt, bei -20°C eingefroren und bis zur Verwendung in den Zellkulturversuchen (Abschnitt 3.3.2) gelagert.

Nach den beiden Arbeitsschritten wurden an dem SEB-AS-FITC folgende Untersuchungen vorgenommen:

Proteingehaltsbestimmung nach LOWRY, Extinktionsmessungen bei 280 und 495 nm, Antikörpertiterbestimmung, Ermittlung der FITC-Konzentration (siehe Abschnitt 3.2.1) sowie Kalkulation des molaren Farbstoff/Protein(F/P)-Verhältnisses in Anlehnung an die von MAYR et al. (1977) angegebene Formel:

$$\begin{aligned} \text{Mol. F/P} &= \frac{\text{Molekulargewicht } \gamma\text{-Globulin}}{\text{Molekulargewicht FITC}} \times \frac{\text{konz. FITC (mg/ml)}}{\text{konz. Protein (mg/ml)}} \\ &= 410 \times \frac{\text{konz. FITC (mg/ml)}}{\text{konz. Protein (mg/ml)}} \end{aligned}$$

3.3.1.2 Ergebnisse

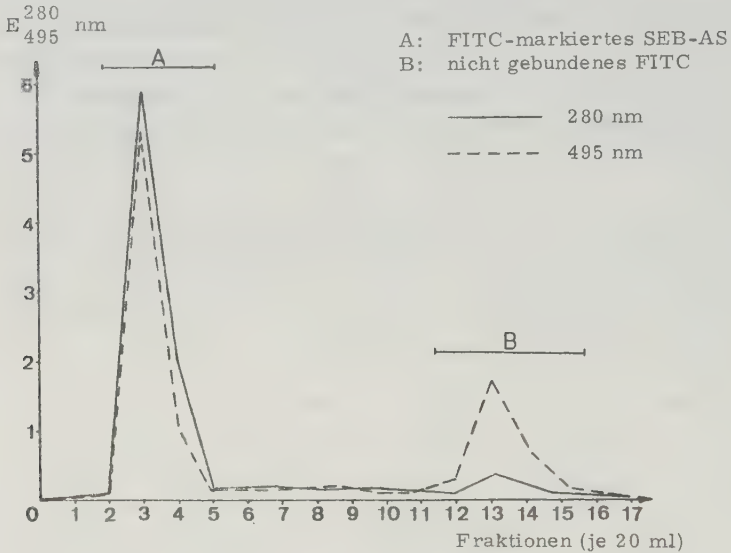
Der erste Arbeitsschritt - Konjugation des Anti-SEB- γ -Globulins mit FITC und anschließende Gelfiltration - führte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Gesamtvolumina zu einem Verlust an SEB-AS (Tabelle 8) von ca. 31 % (berechnet nach der Proteingehaltsbestimmung), der vor allem durch die Abzentrifugation der während der Markierung gebildeten Präzipitate sowie auch durch die Gelfiltration zu erklären ist. Beim Vergleich der Antikörpertiter des SEB-AS und des SEB-AS-FITC konnte, bei Berücksichtigung der durch die Gelfiltration verursachten Volumenvergrößerung, ein Verlust von ca. 25 % bei überschlägiger Berechnung festgestellt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Charakteristika von Anti-SEB- γ -Globulin und FITC-markiertem Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS-FITC)

Eigenschaft	Anti-SEB- γ -Globulin	SEB-AS-FITC (nach Gelfiltration)	SEB-AS-FITC (nach DEAE-Zellulose und Ultrafiltration)		
			Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III
Proteingehalt (mg/ml)	17,5	2	1,5	1,7	0,7
Antikörpertiter	1:128	1:16	1:16	1:16	1:4
FITC-Gehalt (mcg/ml)	/	20	3,75	7	4,1
Mol. F/P-Verhältnis	/	4,1	1,0	1,7	2,4
Menge (ml)	6,7	40	9	8	5

Durch die Gelfiltration mit Sephadex G 50 wurde, wie aus der Abbildung 7 hervorgeht, die Abtrennung des nicht gebundenen FITC aus dem FITC-markierten Anti-SEB- γ -Globulin/FITC-Gemisch erreicht.

Abbildung 7: Elutionsdiagramm von FITC-markiertem SEB-AS-Gemisch unter Verwendung von Sephadex G 50



Die durch den zweiten Arbeitsschritt - Isolierung der optimal markierten Globuline durch die Technik der Reinigung des SEB-AS-FITC-Konjugats mit DEAE-Zellulose und stufenweiser Elution sowie Konzentrierung über Ultrafiltration - verursachten Verluste an SEB-AS-FITC betrugen ca. 62 % (berechnet nach der Proteingehaltsbestimmung). Bei den SEB-AS-FITC-Fractionen I, II und III, die somit ca. 38 % des SEB-AS-FITC (nach Gelfiltration) darstellten, wurde ein molares F/P-Verhältnis von 1,0 (I), 1,7 (II) bzw. 2,4 (III) berechnet. Damit wurde im Vergleich zur eingesetzten SEB-AS-FITC-Lösung mit einem molaren F/P-Verhältnis von 4,1 eine deutliche Reduzierung erreicht.

Die bei der Antikörpertiterbestimmung festgestellten Werte für das SEB-AS-FITC (nach Gelfiltration) von 1:16 sowie für die SEB-AS-FITC-Fractionen I (1:16), II (1:16) und III (1:4) zeigen bei überschlägiger Berechnung, daß etwa 45 % des Antikörpergehalts des SEB-AS-FITC (nach Gelfiltration) in den Fractionen I, II und III enthalten sind.

3.3.2 Zellkulturversuche mit SEB und FITC-markierten SEB-Antikörpern

3.3.2.1 Material und Methodik

Für diese Versuche wurden die Zell-Linien 75SD-G-420 und RK-13 verwendet. Bei dem SEB handelte es sich um das in Abschnitt 3.1.1.1 beschriebene SEB der dritten Reinigungsstufe (SEB III). Zum Nachweis des SEB III in der Zellkultur wurde das in Abschnitt 3.3.1 (Tabelle 8) angeführte, mit FITC markierte Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS-FITC), und zwar Fraktion II, verwendet.

Der Versuchsansatz erfolgte im allgemeinen in folgender Weise: Die Beschickung der Leighton-Röhrchen mit dem zellhaltigen Medium wurde, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend folgte die Zugabe von SEB III (gelöst in PBS-pH 7,5), so daß sich Konzentrationen von 75; 45; 20; 5; 2 und 0,4 mcg/ml Medium ergaben. Bei den Kontroll-Leighton-Röhrchen wurde stattdessen ein entsprechendes Volumen an PBS (pH 7,5) zugesetzt. Die Inkubation der derart beschickten Leighton-Röhrchen wurde bei 37°C im geschlossenen System für 2 bis 3 Tage vorgenommen. Nach abgeschlossener Bebrütung wurde dann zur Herstellung eines Präparats für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung das Deckgläschen aus dem Leighton-Röhrchen entnommen und für 10 Min. in PBS (pH 7,5) bei Raumtemperatur und dreimaligem Wechsel des PBS gründlich gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixation der Zellkulturpräparate mit Methanol für eine Zeitdauer von 15 Min. bei Raumtemperatur. Dieses Fixationsmittel wurde gewählt, da es sich in Vorversuchen anderen (Aceton, Äthanol, Formalin, Isopropylalkohol) als deutlich überlegen erwiesen hatte. Nach der Fixierung und Trocknung der Präparate bei 37°C für 30 Min. schloß sich die Beschickung der Präparate mit dem FITC-markierten Anti-SEB- γ -Globulin an. Dazu wurden die trockenen Präparate kurz in PBS (pH 7,5) getaucht und dann das SEB-AS-FITC (2-3 Tropfen pro Deckgläschen) auf das nunmehr feuchte Präparat getropft. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37°C in einer feuchten Kammer für 30 Min. Darauf folgte das Wa-

schen der Deckgläschen in PBS (pH 7,5) von Raumtemperatur (dreimaliger Wechsel) für 15 Min. Die Präparate wurden dann mit gepuffertem Glycerin (Glycerin und Karbonat-Bikarbonat-Puffer, pH 9,5 im Verhältnis 9:1 gemischt) auf gereinigten Objektträgern eingebettet.

Die Betrachtung der hergestellten Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Universal) mit Auflichtkondensoreinrichtung (III-RS) und Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200 W/4.

Als Kontrollen wurden zur Absicherung der Spezifität der auftretenden Fluoreszenz folgende Ansätze durchgeführt (MAYR et al., 1977):

- 1) Inkubation von SEB-freien Zellkulturen (Kontroll-Leighton-Röhrchen) mit SEB-AS-FITC
- 2) Verwendung von FITC-markiertem Normalserum von Kaninchen anstelle des FITC-markierten Anti-SEB- γ -Globulin
- 3) Blockierung bzw. Hemmung der Bindung von SEB-AS-FITC an SEB durch vorherige Inkubation der Zellkulturen mit nicht markiertem Anti-SEB- γ -Globulin.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, wann das SEB erstmals in den Zellkulturen nachweisbar ist. Für diese Untersuchung wurden Zellkulturen in Leighton-Röhrchen ohne SEB-Zugabe für 2 bis 3 Tage angezüchtet, bis sie mitteldicht gewachsen waren. Für die eigentliche Versuchsdurchführung wurde dann das Nährmedium dekantiert, neues Medium ohne FKS (2 ml/Leighton-Röhrchen) hinzugefügt und durch Zugabe von SEB III eine Konzentration von 75 mcg/ml Medium hergestellt. Nach anschließender, unterschiedlich langer Inkubationszeit (7, 5; 15; 30; 60; 120 Min.) bei 37⁰ C wurden die Deckgläschen entnommen, gewaschen, Methanol-fixiert, mit dem SEB-AS-FITC (Fraktion II) beschickt, gewaschen und in der o.a. Weise eingebettet.

Schließlich sollte geprüft werden, ob auch nach Austausch des toxinhaltigen Mediums (75 mcg/ml) durch frisches Medium SEB noch in den Zellen nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurde das toxinhaltige Nährmedium dekantiert, nachdem die Zellen nach 2- bis 3-tägiger Bebrü-

tung mitteldicht gewachsen waren. Es wurde dann neues Medium (ohne FKS) zugegeben und die Inkubation in verschiedenen Leighton-Röhrchen über unterschiedliche Zeiträume (15; 30; 60; 120 bzw. 240 Min., 18 bzw. 24 Std.) fortgesetzt. Anschließend wurde in der bereits beschriebenen Art und Weise verfahren. Als Vergleich dienten Ansätze, bei denen das toxinhaltige Medium nicht entfernt und durch frisches Medium ersetzt worden war.

3.3.2.2 Ergebnisse

Als Ergebnis kann zusammengefaßt werden, daß bei SEB-Konzentrationen von 75, 45, 20 bzw. 5 mcg/ml Medium in allen Zellen eine deutliche intrazelluläre Fluoreszenz zu erkennen war (s. Bild 7 und 8). Die fluoreszierenden Punkte waren dabei im Zytoplasma der gesamten Zelle sowie auch in den Zellausläufern bei den Gliom-Zellen nachzuweisen. Bei den Proben mit 5 mcg SEB/ml war die Anzahl der fluoreszierenden Punkte im Zytoplasma allerdings bereits deutlich verringert.

Bei der Prüfung verschiedener Verdünnungsstufen des SEB-AS-FITC (Fraktion II) auf ihre färbenden Eigenschaften konnte eine intrazelluläre Fluoreszenz bis zu einer Konjugat-Verdünnung von 1:32 sicher erkannt werden. Die Qualität der Fluoreszenz-Färbung (Brillanz und Anzahl der fluoreszierenden Partikel) nahm aber mit steigender Verdünnung graduell ab:

Verdünnungsstufe	1 : 1	und	1 : 2	3 +	
"	"	1 : 4	und	1 : 8	2 +
"	"	1 : 16	und	1 : 32	1 +
"	"	1 : 64		+	

Die durchgeführten Kontrollen (SEB-freie Zellkulturen mit SEB-AS-FITC; FITC-markiertes Normalserum statt FITC-markiertes Anti-SEB- γ -Globulin; vorherige Inkubation der Präparate mit nicht markiertem Anti-SEB- γ -Globulin) waren stets als negativ zu bewerten.

Erstmals konnten vereinzelte fluoreszierende Punkte im Zytoplasma nach einer Inkubationszeit der Zellkulturen mit dem SEB von 7,5 Min. gesehen werden. Mit zunehmender Bebrütungsdauer konnte eine stetige Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz beobachtet werden: Nach zweistündiger Inkubation war die Fluoreszenz in Ausmaß und Stärke in etwa mit derjenigen vergleichbar, die nach 2- bis 3-tägiger Bebrütung der Zellkulturen mit SEB zu sehen war.

Bei den Versuchen zur Lokalisation des SEB in der Zellkultur nach Entfernen des toxinhaltigen Nährmediums konnte folgendes beobachtet werden:

Nach einer 15-minütigen Inkubation der Zellkulturen mit neuem, toxin-freiem Medium war die intrazelluläre Fluoreszenz bereits etwas verringert. Diese Abnahme des intrazellulär nachzuweisenden SEB verstärkte sich mit zunehmender Bebrütungsdauer der Zellkulturen mit dem neuen, toxinfreien Nährmedium. Nach 24-stündiger Inkubationsdauer war die Fluoreszenz im Zellplasma dann so weit verringert, daß nur noch einzelne fluoreszierende Punkte zu sehen waren.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnisse die Schlußfolgerung gezogen werden, daß SEB von den Zellkulturen aus dem Nährmedium aufgenommen wurde und im Zytoplasma frühestens nach 7,5 Minuten Bebrütung nachzuweisen war (Mindestmenge des SEB: 5 mcg/ml Medium).

Die intrazelluläre Lokalisation des SEB geht auch aus der Tatsache hervor, daß bei nicht-fixierten Zellen keine Fluoreszenz zu beobachten war, da die Anti-SEB- γ -Globuline in diesem Fall die Zellmembran offensichtlich nicht passieren konnten. Nach Entfernen des toxinhaltigen Mediums und Ersatz durch neues toxinfreies Medium kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme des intrazellulär nachzuweisenden SEB.

Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop (mit Auflichteinrichtung)

Immunofluoreszenztechnik (Inkubation der Zellkultur mit 75 mcg SEB/ml Medium für zwei Tage - Methanolfixation - Inkubation mit SEB-AS-FITC)

Objektiv 16fach (Bild 7) bzw. 40fach (Bild 8) vergrößernd

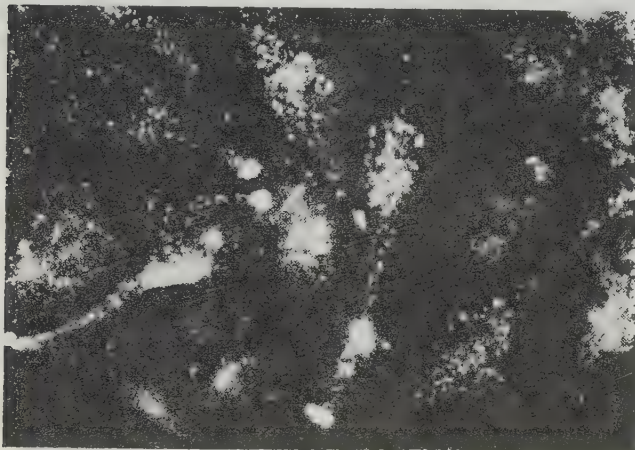


Bild 7: Zellkultur 75SD-G-420 - Immunofluoreszenztechnik

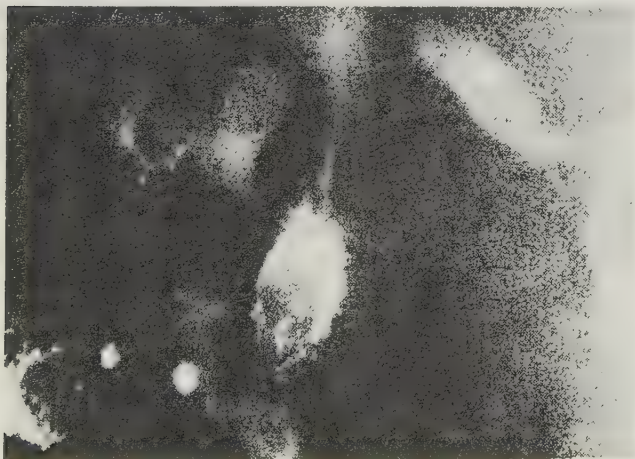


Bild 8: Zellkultur 75SD-G-420 - Immunofluoreszenztechnik

3.4 Nachweis von SEB in Zellkulturen mittels Immunoperoxydase-technik

3.4.1 Markierung von SEB-Antikörpern mit Peroxydase

Die Immunoperoxydasetechnik gewinnt in den letzten Jahren im Vergleich zur Immunfluoreszenztechnik immer mehr an Bedeutung, da sie die Möglichkeiten der Licht- und elektronenmikroskopischen Darstellung bietet und damit eine Lokalisation des Antigens auch auf der subzellulären Ebene erlaubt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher geprüft werden, ob eine Markierung von Anti-SEB- γ -Globulin mit Peroxydase sowie der Nachweis von SEB in Zellkulturen mit dieser Technik möglich ist.

3.4.1.1 Material und Methodik

Die Markierung des SEB-AS mit Peroxydase erfolgte in Anlehnung an die von AVRAMEAS und TERNYNCK (1971) bzw. MAYR et al. (1977) gegebenen Hinweise. Im einzelnen wurde so vorgegangen: Zu 1 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers (pH 6,9) wurden 50 μ l einer 25%igen wäßrigen Glutaraldehydlösung (Sigma) zugegeben, so daß sich eine Konzentration von 1,25 % Glutaraldehyd im Puffer ergab. Zu dieser Lösung wurden dann 10 mg Meerrettich-Peroxydase - POD - (Sigma; RZ 3,0; Aktivität 250-330 units/mg) hinzugefügt, gut durchmischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Glutaraldehyds aus der Lösung wurde eine Gelfiltration (Sephadex G 25 coarse) angewandt (Elution mit 0,15 M NaCl, Säulengröße: 2 x 40 cm). Bei den dabei erhaltenen braunen Fraktionen (je 10 ml) wurden im Spektralphotometer (Zeiss) bei 403 nm, dem Absorptionsmaximum der POD, die Extinktionswerte gemessen und anhand dieser die POD-haltigen Fraktionen gepoolt. Dieser Pool an "aktivierter" POD wurde dann mittels Ultrafiltration (Amicon) über eine PM 10-Membran auf 1 ml konzentriert.

Bei dem für die Markierung verwendeten SEB-AS handelte es sich um das gleiche Material, wie es bei der Herstellung von SEB-AS-FITC (siehe Abschnitt 3.3.1) verwendet worden war (Antikörpertiter 1:128; Proteinkonzentration 17,5 mg/ml). Zu 0,55 ml dieses gegen NaCl-

Phosphatpuffer (pH 7,2) dialysierten Anti-SEB- γ -Globulins (siehe Abschnitt 3.3.1) wurde dann unter leichtem Schütteln die konzentrierte "aktivierte" POD (1 ml) zugesetzt. Sofort anschließend wurden 0,1 ml eines 1 M Karbonat-Bikarbonat-Puffers (pH 9,5) unter Rühren zugegeben. Diese Mischung wurde dann für 24 Std. bei +4°C inkubiert. Schließlich wurde noch 1-Lysin - 0,08 ml einer 0,2 M Lösung (Roth) - hinzugefügt (zwecks Absättigung der restlichen aktiven Gruppen des Glutaraldehyds), erneut für eine Std. bei +4°C inkubiert und danach bei +4°C gegen PBS (pH 7,5) dialysiert (drei Tage lang bei mehrmaligem Dialysatwechsel).

Nach abgeschlossener Dialyse wurde das POD-markierte Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS-POD) bis zur Verwendung in den Zellkulturversuchen (Abschnitt 3.4.2) bei +4°C gelagert.

Abschließend wurden jeweils Extinktionsmessungen (280 und 493 nm), Proteingehalts- und Antikörpertiterbestimmungen (siehe Abschnitt 3.3.1) durchgeführt. Außerdem wurden in gleicher Weise wie bei der Antikörpertiterbestimmung beschickte Objektträger statt mit Coomassie Brilliant Blue mit 3-Amino-9-Äthylcarbazol (Fa. Sigma), einem POD-Aktivitäts-anzeigenden Farbstoff, gefärbt (GRAHAM, LUNDHOLM und KARNOVSKY, 1965). Ergänzend wurde ein Absorptionsspektrum des SEB-AS-POD-Konjugats im Wellenlängenbereich von 260 - 540 nm angelegt (Beckman-Spektralphotometer).

3.4.1.2 Ergebnisse

Bei den am Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS) vor und nach Markierung mit POD vorgenommenen Untersuchungen hinsichtlich Proteingehalt (Bestimmung nach LOWRY) und Antikörpertiter wurden folgende Ergebnisse erzielt, die in der folgenden Tabelle 9 zusammengefaßt sind.

Beim Vergleich des Proteingehalts des 2 ml SEB-AS-POD (12,0 mg) mit der eingesetzten Proteinmenge des 0,55 ml SEB-AS und POD (Summe 19,6 mg) mußte ein Verlust von ca. 40% festgestellt werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei der Proteinbestim-

Tabelle 9: Charakteristika von Anti-SEB- γ -Globulin und POD-markiertem Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS-POD)

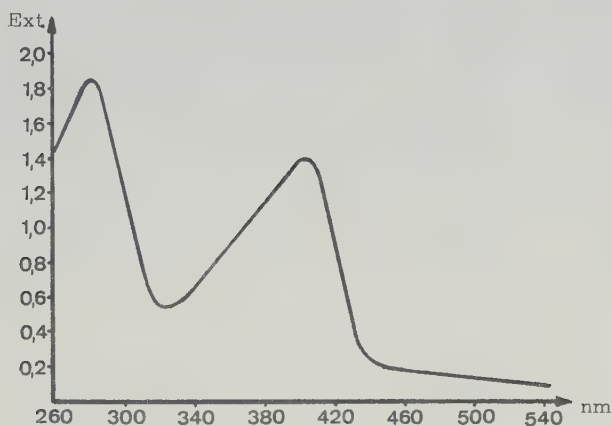
Eigenschaft	SEB-AS	SEB-AS-POD
Proteingehalt (mg/ml)	17,5	6,0
POD-Einwaage (mg)	10	/
Antikörpertiter	1 : 128	1 : 16
Menge (ml)	0,55	2,0

nung nach LOWRY bei Meerrettich-POD wegen des besonders niedrigen Molekulargewichts Schwierigkeiten auftreten können (BERGMEYER, 1974). Daraus folgt, daß der Proteingehalt des SEB-AS vor und nach POD-Markierung nur bedingt vergleichbar ist. Bei der vergleichenden Abschätzung der Antikörpertiter des SEB-AS bzw. des SEB-AS-POD kann, unter Berücksichtigung der verschiedenen Volumina, eine Reduzierung des Antikörpergehalts um etwa eine Zweierstufe konstatiert werden (ca. 45 %).

Durch die Färbung der zur Antikörpertiterbestimmung dienenden Agarose-Objektträger mit 3-Amino-9-Äthylcarbazol konnte eine deutliche spezifische Anfärbung der Präzipitationslinien beobachtet werden. Dies läßt auf eine erfolgreiche Kopplung der POD an das SEB-AS und auf eine ungestörte Präzipitation des SEB durch das SEB-AS-POD schließen.

Für eine gelungene Markierung des SEB-AS mit POD spricht auch das Absorptionsspektrum des SEB-AS-POD, das die für SEB-AS bzw. POD charakteristischen Peaks bei 280 (SEB-AS) bzw. 403 nm (POD) zeigt (Abbildung 8).

Abbildung 8: Absorptionsspektrum des SEB-AS-POD (Verdünnung 1 : 4)



3.4.2 Zellkulturversuche mit SEB und Peroxydase-markierten SEB-Antikörpern

3.4.2.1 Material und Methodik

Diese Versuche wurden in gleicher Anordnung wie im Abschnitt 3.3.2 durchgeführt. Es wurde die Zell-Linie 75SD-G-420 verwendet sowie das in Abschnitt 3.4.1 (Tabelle 9) angeführte, mit Meerrettich-Peroxydase markierte Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS-POD) zum SEB-Nachweis eingesetzt.

Die Zellaussaat erfolgte in gleicher Weise wie sie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben wurde; anschließend wurde in PBS (pH 7,5) gelöstes SEB III zugegeben, so daß eine Konzentration von 75 mcg/ml Medium bestand. Bei den Kontroll-Leighton-Röhrchen wurde stattdessen ein entsprechendes Volumen an PBS (pH 7,5) zugegeben. Nach einer Bebrütung bei 37°C im geschlossenen System wurden die bewachsenen Deckgläschen aus den Leighton-Röhrchen entnommen und mit PBS (pH 7,5) von Raumtemperatur (dreimaliger Wechsel) für 15 Min. gewaschen. Die anschließende Fixation wurde mit Methanol (-20°C) bzw. mit Aceton (+4°C) für einen

Zeitraum von 15 Min. vorgenommen. Danach folgte die Trocknung der Präparate (30 Min.) bei 37°C und - nach kurzem Anfeuchten in PBS (pH 7,5) - die Beschickung mit dem SEB-AS-POD in den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:4 (2-3 Tropfen pro Deckgläschen). Die Präparate wurden für 30 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert und dann 30 Min. in PBS (pH 7,5; dreimaliger Wechsel) und einmal kurz in Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet.

Für den eigentlichen Nachweis der an das Anti-SEB- γ -Globulin gebundenen POD wurden zwei verschiedene Reaktionen angewendet:

3-Amino-9-Äthylcarbazol (AEC)-Reaktion (GRAHAM, LUNDHOLM und KARNOVSKY, 1965) - 2 mg 3-Amino-9-Äthylcarbazol (AEC; Fa. Sigma) wurden in 0,5 ml Dimethylformamid aufgelöst. Dazu wurden 9,5 ml eines 0,05 M Acetatpuffers (pH 5,0) gegeben und gründlich gemischt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde noch ein Tropfen (0,05 ml) einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung hinzugefügt. Die in der o.a. Weise vorbereiteten Zellkulturpräparate wurden mit dieser Lösung 5 Min. inkubiert, dann in Aqua dest. gewaschen und mit Glycerin auf Objektträger eingebettet;

Benzidin-Reaktion (MAYR et al., 1977) - Zuerst wurde eine 0,05%ige 3,3'-Diamino-Benzidintetrachloridlösung (DAB; Fa. Sigma) in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) hergestellt. Kurz vor Gebrauch wurde 0,1 % Wasserstoffperoxid zugesetzt. Die Inkubation der o.a. Zellkulturpräparate mit dieser Lösung dauerte 10 Min. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. und in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) wurden die Präparate in einer Alkoholreihe entwässert, mit Xylol behandelt und in Kanadabalsam eingebettet.

Durch Peroxydase-Aktivität erzeugte Reaktionsprodukte (Oxidation von AEC bzw. DAB) stellen sich dann als rot- (AEC) bzw. braungefärbte (DAB) Bezirke (Granula) in den Zellen dar.

3.4.2.2 Ergebnisse

Die in einer begrenzten Zahl durchgeführten Versuche der SEB-Lokalisation in Zellkulturen erbrachten bisher keine eindeutig positiven Ergebnisse. Bei Anwendung der AEC-Reaktion konnten nach Methanol-Fixation folgende Beobachtungen bei der lichtmikroskopischen Beurteilung gemacht werden: Bei den Zellkulturen, die mit SEB (75 mcg/ml) inkubiert worden waren, konnte im Vergleich zu Zellkulturen ohne Toxinzusatz in einer größeren Anzahl von Zellen eine deutliche rote Anfärbung festgestellt werden. Bei stärkerer mikroskopischer Vergrößerung (1000fach) wurden zusätzlich zahlreiche kleine rote Punkte im Bereich dieser angefärbten Zellen beobachtet, wobei es aber nicht möglich war, eine genauere Lokalisation (Zytoplasma oder Zellmembran) anzugeben. Die mitgeführten Kontrollpräparate (Zellkulturen ohne Toxinzusatz) zeigten keine auf das Vorhandensein von SEB-AS-POD und SEB hinweisende Anfärbung. Bei der DAB-Reaktion waren keine Abgrenzungen zwischen SEB-haltigen und SEB-freien Proben möglich, da es vielfach zu unspezifischen bräunlichen Färbungen der Zellen kam.

Bei der Verwendung von Aceton als Fixationsmittel und anschließender AEC-Reaktion kam es sowohl bei den mit als auch ohne SEB bebrüteten Zellkulturen zu einer allgemeinen diffusen roten Anfärbung sehr vieler Zellen. Auch bei der Verwendung der DAB-Reaktion statt der AEC-Reaktion erfolgte eine unspezifische bräunliche Färbung der Zellen, die allerdings im allgemeinen bei mit Toxin inkubierten Zellkulturen stärker war als bei Zellkulturen ohne Toxinzusatz.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß bei Verwendung der Methanolfixation und der AEC-Reaktion der Nachweis des SEB in der Zellkultur möglich war, die dabei erzielten Ergebnisse aber im Vergleich zur direkten Fluoreszenztechnik und zur Immunfluoreszenzmethode noch nicht zufriedenstellend sind.

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Die Forschung über die pathogene Wirkung der SE bei Säugern konnte zwar in den letzten zwanzig Jahren wesentliche Fortschritte erzielen, ohne jedoch bisher über den prinzipiellen Wirkungsmechanismus und Angriffspunkt der SE im Organismus die für die Bekämpfung dieser Intoxikationen erwünschte Klarheit zu vermitteln.

Bei oraler Aufnahme von SE kommt es i. a. nach 1-6 Std. zu Erbrechen, meist auch Diarrhoe. Andere Symptome können sein: Speichelfluß, Übelkeit, abdominale Krämpfe, Kopfschmerzen, Muskelkrämpfe, Schweißausbruch und Erschöpfung. In schweren Fällen können Körpertemperatur ansteigen oder auch subnormal sein, Blutdruck sinken und Blut bzw. Schleim im Stuhl und Erbrochenen auftreten. Todesfälle sind jedoch sehr selten (BERGDOLL, 1970). Untersuchungen über das Wirkungsprinzip der SE ergaben, daß sie offensichtlich ausgehend von lokalen neuralen Rezeptoren vermutlich im Gastrointestinaltrakt via Vagus und sympathisches Nervensystem eine Stimulation des Brechzentrums bedingen (SUGIYAMA und HAYAMA, 1965; ELWELL et al., 1975). Eine zentral wirkende humorale Stimulation des Brechzentrums dürfte demgegenüber nicht in Frage kommen, da SE aus dem Darm nicht oder nur in unbedeutenden Mengen resorbiert werden (ELWELL et al., 1975). Die durch orale Aufnahme von SE hervorgerufene Diarrhoe scheint das Resultat eines gestörten Wasser- und Elektrolyttransports im Dünndarm, insbesondere im Jejunum, zu sein (SHEMANO, HITCHENS und BEILER, 1967; SULLIVAN, 1969; SUSSMAN, RYAN und SHIELDS, 1970; SULLIVAN und ASANO, 1971; ELIAS und SHIELDS, 1976), und zwar infolge einer verstärkten Sekretion seitens der Mukosa, weniger aber einer verminderten Resorption von Wasser und Elektrolyten. Hierbei handelt es sich offensichtlich - ähnlich wie beim Cholera-Toxin (SUSSMAN, RYAN und SHIELDS, 1970) - um eine funktionelle Störung, die auch auftritt, ohne daß mikroskopisch wahrnehmbare strukturelle Veränderungen der Mukosa vorliegen (ELIAS und SHIELDS, 1976). Allerdings kann eine SE-bedingte Hypermotilität des Darms aufgrund eines

neuralen Reflexes innerhalb des Magen-Darm-Trakts nicht vollständig ausgeschlossen werden (ELWELL et al., 1975; ELIAS und SHIELDS, 1976).

Die pathologischen Veränderungen nach i.v. SE-Applikation sind selbst bei niedriger Toxindosis recht dramatisch. So kommt es zu Fieber, Oligurie, Hypotonie, Schock, Dyspnoe, Zyanose und Tod (BERGDOLL, 1970), und zwar häufig ohne die bei oraler SE-Aufnahme typischen Symptome Erbrechen und Durchfall (CRAWLEY et al., 1966a). Die großen Veränderungen der Körperflüssigkeitskompartimente - Abnahme des Blutvolumens und Gesamtkörperwassers (LIU, GRIFFIN und FAULKNER, 1976) - sowie die Ausbildung von Lungenödemen (FINEGOLD, 1967; STILES und DENNISTON, 1971) sind weitere Kennzeichen der SE-Toxämie. Die exakte Ursache des SE-induzierten Todes ist jedoch noch nicht bekannt (LIU, GRIFFIN und HILMAS, 1978); auch wenn verschiedene Mechanismen - z.B. Dehydratation (LIU, GRIFFIN und FAULKNER, 1976), Funktionsstörungen von Herz und Lunge (LIU, DELAUTER und FAULKNER, 1977) oder Blutansammlung in den peripheren Kapillaren (BEISEL, 1972) - diskutiert wurden. Hauptangriffspunkt der intravenös verabfolgten SE könnten die Endothelzellen der Kapillaren sein. Hierfür sprechen zumindest die Beobachtungen von FINEGOLD (1967) sowie STILES und DENNISTON (1971), daß die Endothelzellen der Lungenkapillaren Degeneration und Nekrose aufwiesen. Möglicherweise stellen jedoch auch andere Organe (z.B. Nieren, Leber) oder Gewebe ebenfalls Angriffspunkte für intravenös injizierte SE dar. Die Tatsache, daß es nach i.v. Injektion von SE bei Rhesusaffen wiederholt zu Todesfällen ohne vorhergehendes Erbrechen (oder Durchfall) gekommen ist, läßt allerdings den Schluß zu, daß die Wirkungsmechanismen für Erbrechen und Durchfall einerseits und Toxämie andererseits unterschiedlich sein dürften (BERGDOLL, 1970).

Für die Untersuchungen zur Wirkung von SE in vivo wie auch für den Nachweis der biologischen Aktivität der SE wurden bisher in erster Linie Rhesusaffen verwendet, andere Tierarten weniger, da sie im Gegen-

satz zu den Primaten zum einen auf die orale Verabreichung von SE nicht mit dem Leitsymptom Erbrechen reagieren bzw. zum anderen unspezifische, nicht durch SE hervorgerufene Reaktionen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnten. Aus tierschützerischen und finanziellen Erwägungen heraus wurden jedoch seit einigen Jahren Überlegungen angestellt, ob nicht zumindest der Nachweis der biologischen Aktivität von SE auch ohne Versuchstiere - z.B. mit Zellkulturen - möglich ist. Außerdem wurde diskutiert, Zellkulturen als Modell zum Studium des Wirkungsmechanismus von SE einzusetzen (SCHAEFFER, 1970). Die Prüfung von verschiedenen primären und permanenten Zell-Linien menschlichen und tierischen Ursprungs auf ihre Eignung zum Nachweis von SE erbrachte bisher jedoch relativ widersprüchliche Ergebnisse. So konnten z.B. SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS (1966 und 1967), GRIGOROVA und DANON (1968), URBACH, OEHRING und BRUNNENMANN (1968), SCHAEFFER (1970), RAKAROWA, STEFANOWA und STANKOWA (1971), TERPLAN und ZAADHOF (1976) sowie ZIETZER (1978) SE-bedingte cytopathogene Effekte (CPE) bei Zellkulturen beobachten, während MILONE (1962), KIENITZ und SCHMELTER (1964) sowie HALLANDER und BENGTSSON (1967) aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse davon ausgingen, daß SE bei Zellkulturen keine signifikanten Effekte hervorruft.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher die Wirkung von SEB unterschiedlichen Reinheitsgrades auf verschiedene Zellkulturen geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene SEB-Präparationen verwendet, und zwar SEB I (Reinigung nur über Amberlite CG 50), SEB II (Reinigung über Amberlite CG 50 und Carboxymethylcellulose CM 22), SEB IIS (Reinigung über Amberlite CG 50 und Sephadex G 75) sowie SEB III (Reinigung über Amberlite CG 50, Carboxymethylcellulose CM 22 und Sephadex G 75). Die Reinigung des SEB erfolgte in Anlehnung an die von SCHANTZ et al. (1965 und 1972) gemachten Angaben. Der Reinheitsgrad des SEB ist insoweit von großer Bedeutung für die Durchführung der Zellkulturversuche, als zahlreiche andere Sta-

phylokokken-Stoffwechselprodukte, insbesondere Hämolysine und Nukleasen (HALLANDER und BENGTTSSON, 1967), ebenfalls in der Lage sein sollen, CPE auszulösen. Die im Hinblick auf die erwähnten Stoffwechselprodukte durchgeführten Untersuchungen ließen erkennen, daß nur SEB I größere Mengen an Nukleasen und Hämolysinen enthielt, während SEB III frei davon war. Die beiden anderen Präparate (SEB II und SEB IIS) enthielten zwar Nukleasen (in geringen Mengen), aber keine Hämolysine. Auf eine Erhitzung der Hämolysine bzw. Nukleasen enthaltenden SEB-Präparate auf 80-100°C - wie sie allgemein empfohlen wird - wurde verzichtet, da hierdurch die z.T. relativ hitzestabilen Hämolysine und die Thermonuklease nicht ausgeschaltet werden können und außerdem eine Veränderung der biologischen Aktivität der SEB nicht mit Sicherheit auszuschließen ist. Die Prüfung der vier SEB-Präparationen auf Auslösung von CPE bei Zellkulturen wurde mit den bereits von ZIETZER (1978) eingesetzten Zell-Linien 75SD-G-376 und 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1979) sowie RK-13 (Flow) durchgeführt; zusätzlich wurde die besonders häufig für den SE-Nachweis verwendete Zell-Linie HeLa - ATCC- CCL 2 - (MILONE, 1962; HALLANDER und BENGTTSSON, 1967; URBACH, OEHRING und BRUNNENMANN, 1968; SCHAEFFER, 1970; RAKAROWA, STEFANOWA und STANKOWA, 1971; TERPLAN und ZAADHOF, 1976; ZIETZER, 1978) bei SEB II sowie die Zell-Linie BHK-21 (ATCC-CCL 10) bei SEB IIS mitgeführt. Methodisch wurde dabei so vorgegangen, daß SEB den Zellkulturen sofort nach der Teilung und Abfüllung in Teströhrchen (SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS, 1967; RAKAROWA, STEFANOWA und STANKOWA, 1971; TERPLAN und ZAADHOF, 1976; ZIETZER, 1978) bzw. erst nach dem Dichtwachsen des Zellrasens und Mediumwechsel (MILONE, 1962; KIENITZ und SCHMELTER, 1964; SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS, 1966; HALLANDER und BENGTTSSON, 1967; URBACH, OEHRING und BRUNNENMANN, 1968; GRIGOROVA und DANON, 1968; SCHAEFFER, 1970) zugegeben wurde. Die Zellkultur-Teströhrchen wurden bei 37°C im geschlossenen System inkubiert. Die Beurteilung der Zellkulturen hinsichtlich eventuell auftretender CPE (Wachstumshemmung, Ablös-

sung der Zellen, Granulation und Vakuolisierung) wurde bei täglicher Beobachtung im Umkehrmikroskop im Vergleich zu parallel mitlaufenden Kontrollen (Zellkulturen ohne Toxinzusatz) vorgenommen. Als positive Reaktion einer der getesteten SEB-Konzentrationen (200, 100, 50 und 25 mcg/ml Medium sowie zusätzlich 12 und 6 mcg/ml Medium bei SEB I bzw. 400 mcg/ml Medium bei SEB III) wurde gewertet, wenn in mindestens zwei Röhrchen mikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen vorlagen.

Die bei diesen Versuchen erzielten Ergebnisse zeigten bei allen Zell-Linien recht deutliche Unterschiede in der cytopathogenen Aktivität der vier geprüften SEB-Präparationen auf. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit zunehmender Reinheit des SEB dessen Cytopathogenität abnahm: SEB I (55 % rein; Anwesenheit von Hämolytinen und Nukleasen) hatte die größte, SEB III (70 % rein; Abwesenheit von Hämolytinen und Nukleasen) die geringste zellschädigende Wirkung, SEB II (68 % rein; Anwesenheit von Nukleasen) und SEB IIS (57 % rein; Anwesenheit von Nukleasen) nahmen eine Mittelstellung ein. Dabei ergaben sich folgende, spätestens drei Tage nach SEB-Zusatz erreichte Effektivitätsgrenzen: bei SEB I 6 mcg, bei SEB II und SEB IIS 25 mcg und bei SEB III 200 mcg jeweils pro ml Medium. Für SEB IIS wurde damit der gleiche Grenzwert wie von ZIETZER (1978) registriert, der ein in gleicher Weise gereinigtes SEB verwendet hatte. Die durch die drei Präparationen SEB I, II und IIS hervorgerufenen Zellschädigungen waren zwar von ihrem Charakter her als gleichartig zu beurteilen (Zellgranulation, Wachstumshemmung, Abrundung und Ablösung von Zellen), doch bestanden zwischen SEB I einerseits sowie SEB II und SEB IIS andererseits deutliche Unterschiede hinsichtlich der Intensität der durch die gleichen SEB-Mengen hervorgerufenen CPE und ihres erstmaligen Auftretens. So konnten nach 24 Std. bei SEB I bereits deutliche CPE bei 200, 100, 50 und 25 mcg/ml Medium festgestellt werden, bei SEB II und SEB IIS jedoch nur bei 200 und 100 mcg/ml Medium. Im Gegensatz dazu waren die CPE bei SEB III nur durch das Auftreten von ab-

gelösten, freischwimmenden Zellen (in den ersten Tagen) sowie geringgradige Degenerationsvorgänge (gegen Ende der Inkubationszeit) gekennzeichnet. Die für SEB I, II und IIS typischen cytopathogenen Effekte Zellgranulation und Wachstumshemmung konnten bei SEB III bei keiner der geprüften Toxinkonzentrationen (maximal 400 mcg/ml Medium) registriert werden. Zusätzlich durchgeführte mikroskopische Untersuchungen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter Zellkulturen bestätigten im übrigen das Vorliegen der bei Betrachtung der lebenden Zellen erhobenen Befunde (SEB I, II, IIS: verringerte Zellzahl - vor allem bei SEB I -, Vakuolenbildung, z.T. Kernzertrümmerung und Kernpyknose; SEB III: Ablösung einzelner Zellen aus dem Zellrasen).

Die Reaktion der Zellkulturen auf Zusatz von SEB hing bei den eigenen Versuchen offensichtlich in viel größerem Maße von der Reinheit des zugegebenen SEB ab als von der Art und Herkunft der Zellen bzw. der Versuchsbedingungen. So konnten bei den verwendeten Zell-Linien keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Effektivitätsgrenze und der Intensität der CPE bei SEB-Präparationen gleichen Reinheitsgrades konstatiert werden. Auch bei den beiden verwendeten Testmethoden - Toxinzusatz unmittelbar nach Zellaussaat bzw. nach Dichtwachsen der Zellen und Mediumwechsel - konnte kein deutlicher Unterschied in der Empfindlichkeit gesehen werden. Allerdings hat der sofortige Toxinzusatz nach Zellaussaat den Vorteil, daß die Versuchsdurchführung einfacher ist und die Ergebnisse früher vorliegen.

Ein Vergleich der in den eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse mit jenen anderer Autoren zeigt, daß eine Übereinstimmung mit den von MILONE (1962) sowie von KIENITZ und SCHMELTER (1964) veröffentlichten Resultaten insofern besteht, als von diesen Autoren zum Ausdruck gebracht wurde, daß mit zunehmendem Reinigungsgrad des SEB eine Abnahme der cytopathogenen Eigenschaften einhergeht. Nach Ansicht dieser Autoren sind in erster Linie andere neben dem SEB im Untersuchungsmaterial in unterschiedlicher Menge vorhandene cytotoxische Substanzen ursächlich an der Ausbildung der CPE beteiligt,

während das SEB selbst keine wesentliche Rolle spielt. Als derartige cytotoxische Substanzen wurden von HALLANDER und BENGTTSSON (1967) u.a. alpha-, beta- und delta-Lysin, Lipase, Hyaluronidase und Staphylokinase in Betracht gezogen, ohne daß jedoch bei allen diesen sichere CPE nachgewiesen werden konnten. Dies könnte im Hinblick auf die eigenen Ergebnisse bedeuten, daß die besonders starken CPE beim SEB I auf den relativ hohen Gehalt an Hämolytinen und Nukleasen zurückzuführen sind. Allerdings können auch andere Staphylokokken-Stoffwechselprodukte für die Auslösung der CPE verantwortlich gewesen sein. Diese Vermutung liegt deswegen nahe, weil bei SEB II und SEB IIS trotz nur sehr geringen Nukleasegehalts noch relativ stark ausgeprägte CPE nachweisbar waren. Die Frage, ob die bei Verwendung von SEB III in Konzentrationen von mindestens 200 mcg/ml Medium registrierten CPE allein durch SEB oder auch durch Begleitstoffe bedingt waren, kann nicht schlüssig beantwortet werden. Das für diese Untersuchungen eingesetzte Material enthielt zwar keine Hämolytine und Nukleasen, war jedoch mit einem Reinheitsgrad von 70 % nicht unbedingt frei von cytotoxischen Begleitstoffen. Zwar wäre aufgrund der Angaben von MILONE (1962), KIE-NITZ und SCHMELTER (1964) sowie HALLANDER und BENGTTSSON (1967), daß hochgereinigtes SEB keine CPE bewirkt, davon auszugehen, daß es sich bei den eigenen Versuchen nicht um SEB-spezifische CPE handelte, doch erzielten andererseits SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS (1966 und 1967) sowie SCHAEFFER (1970) mit ca. 96-99 % reinem SEB bzw. TERPLAN und ZAADHOF (1976) mit ca. 80-90 % reinem SEB deutliche CPE, und zwar bereits ab Konzentrationen von 15-30 mcg/ml (TERPLAN und ZAADHOF, 1976) bzw. 40-60 mcg/ml (SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS, 1966). Möglicherweise sind die Differenzen in den Untersuchungsergebnissen zur Cytopathogenität von hochgereinigtem SEB auch bedingt durch die Verschiedenartigkeit der Zellkulturen bzw. der Versuchsdurchführung oder anderer bisher nicht erkannter Umstände. Dieses zu klären, bedarf es noch ergänzender Untersuchungen. Unabhängig davon kann jedoch aufgrund der eigenen Untersuchungen und der Literaturangaben die Schlußfolgerung gezogen werden, daß bisher

ein auf der Erfassung cytopathogener Effekte bei Zellkulturen beruhender Nachweis der biologischen Aktivität von reinem SEB - wenn überhaupt - nur bei relativ hohen SEB-Konzentrationen möglich ist.

Aufgrund der wenig zufriedenstellenden Ergebnisse bei alleiniger Berücksichtigung von CPE und aufgrund der Tatsache, daß in vivo trotz typischer klinischer Symptome einer Staphylokokken-Intoxikation keine Zell-Läsionen erforderlich zu sein scheinen, wurde im zweiten Teil der Arbeit erstmals geprüft, ob nicht auch ein SEB-Nachweis über Zellkulturen mittels direkter Fluoreszenz-, Immunfluoreszenz- oder Immunoperoxydase-Technik möglich ist. Voraussetzung hierfür ist, daß SEB von den Zellen ad- bzw. resorbiert wird und sich zellulär lokalisieren läßt. Alle drei angeführten Methoden sind in Mikrobiologie, Pathologie und anderen medizinischen Fachgebieten seit längerem für den Nachweis und die Sichtbarmachung von Antigenen und Antikörpern verschiedenster Art gebräuchlich. Im Zusammenhang mit SE wurden die direkte Fluoreszenz- und die Immunfluoreszenz-Technik z.B. für Untersuchungen über die Verteilung und Lokalisation von SEB im Körper eingesetzt (NORMANN, JAEGER und JOHNSEY, 1969; NORMANN und STONE, 1972). Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik wurde weiterhin versucht, SEB auf der Zelloberfläche von *Staphylococcus aureus* nachzuweisen (FRIEDMAN und WHITE, 1965; FORSGREN, FORSUM und HALLANDER, 1972; FORSUM und FORSGREN, 1972) bzw. in Lebensmitteln und Kulturmedium zu entdecken (GENIGEORGIS und SADLER, 1966 a und b; STARK und MIDDAUGH, 1969 und 1970). Die Immunoperoxydase-Technik fand demgegenüber für entsprechende Fragestellungen keine Anwendung (siehe auch SIMON, 1978).

Für die Markierung von SEB III (direkte Fluoreszenztechnik) wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet, das heute der Farbstoff der Wahl für derartige Zwecke ist (MAYR et al., 1977). Bei der eigentlichen Herstellung des FITC-markierten SEB (SEB-FITC) wurde dann in Anlehnung an NORMANN, JAEGER und JOHNSEY (1969) sowie MAYR et al. (1977) vorgegangen. Dies beinhaltete auch eine Entfernung nicht

gebundenen Farbstoffs vom SEB-FITC-Rohkonjugat mittels Gelfiltration (Sephadex G 50). Das somit erhaltene SEB-FITC-Konjugat hatte eine serologische Aktivität von 450 mcg/ml und eine FITC-Konzentration von 4,5 mcg/ml. Der im Laufe der einzelnen Arbeitsschritte aufgetretene Verlust an SEB betrug ca. 28 %. An dieser Verlustrate waren, wie durch zusätzliche Bestimmungen festgestellt wurde, insbesondere die Gelfiltration und die Ultrafiltration beteiligt. Der SEB-Verlust während der Ultrafiltration von SEB-FITC über eine UM 2-Membran lag im übrigen im Rahmen der von SCHEGGER (1978) gefundenen Verlustrate von 10 - 15 % für in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes natives SEB. Auch wenn möglicherweise die SEB-Verlustraten bei Optimierung der einzelnen Schritte noch reduziert werden können, so sind doch bei der Herstellung von SEB-FITC Einbußen unvermeidlich.

Das für die Immunofluoreszenzmethode benötigte FITC-markierte Anti-SEB- γ -Globulin (SEB-AS-FITC) wurde nach der von MAYR et al. (1977) gegebenen Anleitung hergestellt. Nach der Markierung des Sulfat-freien Anti-SEB- γ -Globulins (Antikörpertiter 1 : 128; Proteinkonzentration 17,5 mg/ml) mit FITC, Zentrifugation und anschließender Gelfiltration über Sephadex G 50 mußte ein γ -Globulin-Verlust von ca. 31 % (Proteingehaltsbestimmung) festgestellt werden. Da auch bei der Ermittlung der Antikörperaktivität (radiale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY) ein Verlust von ca. 25 % registriert wurde, war eine gute Übereinstimmung beider Werte gegeben. Diese verhältnismäßig hohen Einbußen an Anti-SEB- γ -Globulin sind durch die bei der Gelfiltration sowie vor allem bei der Abzentrifugation der während der Markierung gebildeten Präzipitate bedingt und sind als unvermeidlich anzusehen. Da γ -Globuline auch bei Einhaltung optimaler Reaktionsbedingungen nicht gleichmäßig markiert werden, wurde anschließend eine Reinigung des SEB-AS-FITC über DEAE-Zellulose durchgeführt. Auf diese Weise ist eine Abtrennung über- und unterkoppelter γ -Globuline, die als Ursache für die unspezifische Fluoreszenz in Frage kommen, möglich. Das optimale molare Farbstoff/Proteinverhältnis (F/P-Wert), bei dem die unspezifische

Fluoreszenz am niedrigsten ist, wird im allgemeinen mit 1-2, seltener mit 1-4 angegeben (MAYR et al., 1977). Bei den eigenen Versuchen wurden drei Fraktionen des SEB-AS-FITC mit einem in diesem Bereich liegenden F/P-Wert von 1,0 (I), 1,7 (II) bzw. 2,4 (III) erhalten, die im Vergleich zum F/P-Wert des eingesetzten SEB-AS-FITC von 4,1 eine deutliche Verbesserung erkennen ließen. Damit unweigerlich verbunden war ein weiterer beachtlicher Verlust an Anti-SEB- γ -Globulin: die drei Fraktionen enthielten nur noch ca. 38% (Proteingehaltsbestimmung) bzw. 45% (Antikörpergehalt) des eingesetzten markierten Anti-SEB- γ -Globulins. Nach MAYR et al. (1977) sind im allgemeinen etwa 25-50% der eingesetzten Proteine eines Konjugats in den Fraktionen I und II zu finden. Der in der vorliegenden Arbeit für diese Fraktionen errechnete Wert von ca. 34% stimmt mit dieser Angabe also gut überein.

Die Zellkulturversuche (Zell-Linien 75SD-G-420 und RK-13; bei der direkten Fluoreszenztechnik zusätzlich 75SD-G-376) selber wurden in ähnlicher Weise wie bei der Bestimmung der CPE - bei der direkten Fluoreszenztechnik allerdings mit FITC-markiertem SEB statt mit nativem SEB - durchgeführt, und zwar in Leighton-Röhrchen (Deckgläschenmethode). Anschließend an die Inkubation erfolgte eine Fixierung der Zellen (in Parallelversuchen wurde hierauf verzichtet) und Einbettung auf Objektträgern, bevor die Präparate im Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden. Bei der Immunfluoreszenztechnik wurden abweichend davon die Präparate (fixierte und nicht-fixierte) mit FITC-markiertem Anti-SEB- γ -Globulin beschickt, inkubiert, bevor sie auf Objektträgern eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop auf die Anwesenheit an das Antigen gebundener fluoreszierender Antikörper geprüft wurden.

Da Antigene gegenüber verschiedenen Fixierungsmitteln unterschiedlich empfindlich sind, ist es nach MAYR et al. (1977) zweckmäßig, den Einfluß des Fixierungsmittels zu überprüfen. Fixierungsmittel sollten eine ausreichende Fixierung der Zellen gewährleisten, ohne die Fluoreszenz zu beeinträchtigen oder unspezifische Reaktionen zu fördern bzw. bei

der Immunofluoreszenztechnik die Spezifität und Reaktivität der nachfolgenden Antigen-Antikörper-Bindung zu stören. Das Fixierungsmittel der Wahl in der Virologie ist das Aceton, insbesondere deswegen, weil Aceton-fixierte Präparate die brillianteste Fluoreszenz zeigen (MAYR et al., 1977). Auch NORMANN, JAEGER und JOHNSEY (1969) benutzten für ihre Untersuchungen zur Lokalisation von SEB im Gesamtorganismus Aceton als Fixierungsmittel, ohne aber die Eignung anderer Fixierungsmittel zu prüfen. Aufgrund der eigenen Untersuchungen ist jedoch davon auszugehen, daß Aceton zur Fixierung der Zellen beim Nachweis von SEB-FITC bzw. SEB mittels direkter Fluoreszenz- bzw. Immunofluoreszenztechnik weniger gut geeignet ist als Isopropylalkohol, Äthanol und insbesondere Methanol. Im Gegensatz zu den Angaben von MAYR et al. (1977) für virologische Untersuchungen ließ sich nämlich bei Methanol-fixierten Präparaten die brillianteste Fluoreszenz erzielen, während die Intensität bei Verwendung der anderen Fixierungsmittel deutlich herabgesetzt war.

Als Ergebnis der Zellkulturversuche kann zusammengefaßt werden, daß ebenso wie mit der direkten Fluoreszenztechnik auch mit der Immunofluoreszenztechnik nachgewiesen werden konnte, daß SEB-FITC bzw. SEB intrazellulär im Zytoplasma der Zellkulturen lokalisiert (vorhanden) war. Während bei Anwendung der direkten Fluoreszenztechnik FITC-markiertes SEB sowohl bei den fixierten als auch nicht-fixierten Präparaten nachweisbar war, gelang der Nachweis von intrazellulär gelagertem SEB bei der Immunofluoreszenztechnik nur bei fixierten Präparaten. Dies war jedoch auch zu erwarten, da Antikörper in native, unfixierte Zellen nicht eindringen können (MAYR et al., 1977). Im übrigen geht das SEB innerhalb von 2-3 Tagen offensichtlich keine irreversible Bindung mit dem Zytoplasma ein. In ergänzenden Versuchen mit Ersatz des toxinhaltigen Mediums durch neues toxinfreies Medium konnte nämlich festgestellt werden, daß die intrazelluläre Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit des Mediums auf die SEB-haltigen Zellkulturen stetig abnahm. Bei einem Vergleich der beiden Techniken zeigt sich, daß die

Immunofluoreszenztechnik (Nachweisgrenze 5 mcg/ml Medium) eindeutig empfindlicher war als die direkte Fluoreszenztechnik (16 mcg/ml Medium). Dies stimmt insofern mit den Angaben von NAIRN (1969) überein, als dieser von einer allgemeinen Steigerung der Empfindlichkeit durch Anwendung der Immunofluoreszenztechnik anstelle der direkten Fluoreszenztechnik berichtet hatte. Außerdem fiel auf, daß eine Lokalisation (intrazelluläres Vorhandensein) von SEB in den Zellen bei Verwendung von SEB-FITC erst nach einer Einwirkungszeit von 15 Min. nachweisbar war, unmarkiertes SEB (Immunofluoreszenztechnik) aber bereits nach 7,5 Min. Diese geringen Unterschiede dürften jedoch weniger dadurch bedingt sein, daß natives SEB besser in die Zellen eindringen konnte als FITC-markiertes SEB, sondern wohl eher Folge der unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Nachweismethoden sein.

Die Immunoperoxidasetechnik wird in den letzten Jahren zunehmend zum Nachweis von Virusantigenen in Zellkulturen herangezogen, da ihr im Vergleich zur Immunofluoreszenztechnik einige Vorteile zugeschrieben werden. Zu diesen Vorteilen sollen zählen: einfache Herstellung von Konjugaten, Reduktion unspezifischer Reaktionen, Stabilität des Farbkomplexes und damit Erhalt von Dauerpräparaten, präzisere Lokalisation von Antigenen innerhalb des Zytoplasmas oder Zellkerns, Auswertung im normalen Lichtmikroskop bzw. im Elektronenmikroskop (MAYR et al., 1977). Außerdem soll die Empfindlichkeit des Nachweises höher sein oder mindestens der der Immunofluoreszenztechnik entsprechen.

Da über entsprechende Versuche zum Nachweis von SE in Zellkulturen jedoch keine Hinweise gefunden werden konnten, wurden erst einige orientierende Untersuchungen durchgeführt, wobei Meerrettich-Peroxydase (POD) als Enzym für die Markierung von SEB verwendet wurde. Die Vorteile der POD sollen in dem relativ niedrigen Molekulargewicht liegen, das eine gute Penetration des Peroxydase-Antikörper-Konjugates in die Zelle erlaubt (MAYR et al., 1977).

Die Markierung wurde nach der Methode von AVRAMEAS und TERNYNCK

(1971) bzw. MAYR et al. (1977) durchgeführt, wobei zuerst Glutaraldehyd (als Kopplungsvermittler) mit POD inkubiert wurde und dann diese "aktivierte" POD mit dem Anti-SEB- γ -Globulin konjugiert wurde. Die dabei festgestellte Verlustrate an Anti-SEB- γ -Globulin von ca. 40 % (berechnet nach dem Proteingehalt) bzw. ca. 45 % (berechnet nach dem Antikörpergehalt) ist relativ hoch, doch waren auch bei der Markierung mit FITC beträchtliche Verluste festzustellen. Aus der typischen roten Färbung der Präzipitationslinien bei der Antikörpertiterbestimmung nach Inkubation mit dem von GRAHAM, LUNDHOLM und KARNOVSKY (1965) empfohlenen POD-anzeigenden 3-Amino-9-Äthylcarbazol (AEC) sowie aus dem Absorptionsspektrum des SEB-AS-POD mit den charakteristischen Peaks bei 280 nm (SEB-AS) und 403 nm (POD) kann jedoch auf eine erfolgreiche Kopplung der POD an das SEB-AS geschlossen werden.

Bei den Zellkulturversuchen, in denen ähnlich wie bei den vorhergehenden Versuchen mit SEB-FITC bzw. SEB-AS-FITC vorgegangen wurde, konnten bisher noch keine vollständig befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Zwar gelang es, bei Anwendung der Methanol-Fixation und der AEC-Reaktion das SEB in der Zellkultur nachzuweisen, doch war eine genauere Lokalisation (Zytoplasma, Zellmembran, Zellkern) bei lichtmikroskopischer Betrachtung (1000fache Vergrößerung) nicht möglich. Die bisher beschriebene Untersuchungstechnik ermöglicht aber eindeutige Abgrenzungen zwischen SEB-haltigen und SEB-freien Präparaten. Demgegenüber kam es vielfach zu unspezifischen bräunlichen Färbungen von Kontrollpräparaten, wenn statt AEC das Diaminobenzidintetrachlorid (MAYR et al., 1977) eingesetzt wurde. Auch ein Ersatz des bei der Immunofluoreszenztechnik als Fixierungsmittel sehr gut geeigneten Methanols durch Aceton erbrachte keine Verbesserung der Versuchsergebnisse. Es wurden im Gegenteil sowohl bei AEC- als auch bei der Benzidin-Reaktion zum Nachweis der Peroxydase-Antikörperkonjugate allgemein diffuse rote bis braune Anfärbungen bei Zellen mit SEB und ohne SEB beobachtet. Es wäre noch zu prüfen, ob nicht die Verwendung von Glutaraldehyd bzw. Formaldehyd als Fixationsmittel (GRAHAM

und KARNOVSKY, 1966) zu besseren Resultaten führen könnte. Es sollte in jedem Falle möglich sein, die Immunoperoxydasetechnik so zu verbessern, daß - ebenso wie bei der direkten Fluoreszenztechnik und Immunofluoreszenztechnik - eine präzise Lokalisation des SEB möglich ist. Erst wenn diese Voraussetzungen geschaffen sind, sind Versuche zur Nachweisempfindlichkeit angebracht, wobei zu berücksichtigen wäre, daß der Einsatz eines Elektronenmikroskops erhebliche Vorteile erbringen könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Verfahren zum Nachweis von SEB in Zellkulturen und zur zellulären Lokalisation (direkte Fluoreszenztechnik, Immunofluoreszenztechnik, Immunoperoxydasetechnik) sind als geeignet für diese Aufgabenstellung zu bewerten, auch wenn noch methodische Verbesserungen, wie bei der Immunoperoxydasetechnik, wünschenswert sind.

Für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus und des Hauptangriffspunktes der SE müßten Kulturen der Zellen gefunden werden, die als wesentlich für den Ablauf der SE-Intoxikation erkannt wurden, z.B. lokale neurale Rezeptoren, oder die durch SE spezifisch geschädigt werden, z.B. Kapillarendothel-, Darmmukosazellen. Auch an Lymphozyten-Kulturen sollte in diesem Zusammenhang gedacht werden, da über diese mitogene Fähigkeiten der SE entdeckt wurden und daher das Vorhandensein eines Lymphozyten-Rezeptors für SE angenommen wird (WARREN, LEATHERMAN und METZGER, 1975). Für diese Untersuchungen wäre insbesondere eine verbesserte Immunoperoxydasemethode geeignet, die das Erkennen einer subzellulären Lokalisation der SE erlauben und damit evtl. einen Beitrag zur Aufklärung des SE-Wirkungsmechanismus leisten könnte.

5. Zusammenfassung

Im ersten Versuchsabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden vier SEB-Präparationen unterschiedlichen Reinheitsgrads (SEB I, SEB II, SEB IIS und SEB III) auf ihre cytopathogenen Effekte (CPE) bei den permanenten Zell-Linien 75SD-G-376 und 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1979), RK-13 (Flow), HeLa und BHK-21 (ATCC) geprüft. Die Beurteilung der Zellkulturen auf eventuelle CPE (Veränderung der Zellmorphologie, der Zellvermehrung) erfolgte durch die lichtmikroskopische Betrachtung nativer Zellkulturen bzw. davon angefertigter Hämatoxylin-Eosin-Präparate. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, daß mit zunehmender Reinheit des SEB die CPE abnahmen. Die Konzentrationen, ab denen CPE auftraten, betrugen bei SEB I 6 mcg, bei SEB II und IIS 25 mcg und bei SEB III 200 mcg jeweils pro ml Medium nach spätestens dreitägiger Inkubation. Zwischen den getesteten Zell-Linien wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit beobachtet.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde geprüft, ob SEB mit direkter Fluoreszenz-, Immunfluoreszenz- bzw. Immunoperoxidasetechnik nachgewiesen werden kann bzw. ob eine zelluläre Lokalisation in Zellkulturen möglich ist. Die Markierung von SEB III bzw. Anti-SEB- γ -Globulinen erfolgte mit FITC (Fluoreszenzmethoden) bzw. Meerrettich-Peroxydase - POD - (Immunoperoxidasetechnik). Für die Fixierung der Präparate wurden Methanol, Äthanol, Isopropylalkohol und Aceton auf ihre Eignung geprüft. SEB war sowohl mittels der direkten Fluoreszenz- als auch der Immunfluoreszenztechnik im Zytoplasma der verwendeten Zellkulturen (75SD-G-420, RK-13) nachzuweisen. Dabei lag die Nachweisgrenze bei der direkten Fluoreszenztechnik bei 16 mcg SEB-FITC/ml Medium und bei der Immunfluoreszenztechnik bei 5 mcg SEB/ml Medium. Nach Entfernen des toxinhaltigen Mediums und Zugabe von neuem toxinfreiem Medium konnte mit der Immunfluoreszenztechnik eine bereits nach 15 Min. beginnende kontinuierliche Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz festgestellt werden. Als Fixierungsmittel

war Methanol aufgrund der brillantesten Fluoreszenz der Präparate am besten geeignet. Ein Nachweis von SEB in der Zellkultur (75SD-G-420) mittels Immunoperoxidasetechnik war bei Verwendung von Methanol als Fixationsmittel und 3-Amino-9-Äthylcarbazol als Reagenz zum POD-Nachweis möglich, doch ließ sich das Toxin mit der bisherigen Methode zellulär nicht genau lokalisieren.

Summary

In the first section of the investigations four preparations of staphylococcal enterotoxin B (SEB) with different degrees of purity (SEB I, SEB II, SEB IIS, SEB III) were tested for their cytopathogenic effects (CPE) using the cell cultures 75SD-G-376 and 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1979), RK-13 (Flow), HeLa (ATCC), and BHK-21 (ATCC). The examination of the cell cultures for CPE was performed by microscopy of native cell cultures and hematoxyline-eosine stained slides prepared from these cultures. Testing the four preparations of SEB it was found that CPE decreased with increasing purity of SEB. The minimal effective dose per ml of the medium was 6 mcg (SEB I), 25 mcg (SEB II and SEB IIS) and 200 mcg (SEB III) after an incubation time of three days. There were no significant differences between the tested cell cultures with regard to their sensitivity.

In the second section it was examined if there is a possibility for detection and cellular localization of SEB in cell cultures using the direct fluorescent, immunofluorescent and immunoperoxidase technique respectively. Labelling of SEB III and anti-SEB containing γ -globulin was performed with FITC (fluorescent techniques) or horseradish peroxidase - POD - (immunoperoxidase technique). Furtheron it was tested if methanol, ethanol, isopropylalcohol and acetone are suitable as fixatives. SEB could be demonstrated within the cytoplasm of the cell cultures 75SD-G-420 and RK-13 by the direct fluorescent and immunofluorescent technique. The detection limits were: 16 mcg SEB-FITC/ml medium (direct fluorescent technique) and 5 mcg SEB/ml medium (immunofluorescence). After removing the SEB-containing medium and addition of the same medium without SEB it could be found that after a period of 15 minutes the intracellular fluorescence continuously decreased. Methanol was the best qualified fixative on account of the most brilliant fluorescence of the slides. Though SEB could also be detected in the cell culture 75SD-G-420 by the immunoperoxidase technique with methanol as fixative and 3-amino-9-ethylcarbazole as reagent for the POD-assay, SEB could not exactly be localized in the cell with the method used up to now.

6. Literaturverzeichnis

ARCHER, D.L., J.A. WESS, L.O. KAYLOR, S. COX und G.K. MURTHY (1978):

Induction of early maturation of the thymus-dependent, primary in vitro antibody response by staphylococcal enterotoxin D.

Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p. 46

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361.

Biochemistry 6, 1474-1480.

AVRAMEAS, S. (1972):

Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immunohistochemistry.

Histochem. J. 4, 321-330.

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1971):

Peroxydase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration.

Immunochemistry 8, 1175-1179.

BEISEL, W.R. (1972):

Pathophysiology of staphylococcal enterotoxin, type B (SEB) toxemia after intravenous administration to monkeys.

Toxicon 10, 433-440.

BERGDOLL, M.S. (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL:

Microbial Toxins. Bd. III, S. 265-326.

Academic Press, New York.

DERSELBE (1972):

The enterotoxins.

in: J.O. COHEN:

The staphylococci, S. 301-331.

Verlag John Wiley and Sons, Inc. New York.

DERSELBE (1976):

Concerning the structure of the staphylococcal enterotoxins.

in: J. JELJASZEWICZ:

Staphylococci and staphylococcal diseases, S. 583-586.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

DERSELBE (1977):

Persönliche Mitteilung.

BERGDOLL (1978):

Persönliche Mitteilung.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481-1485.

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property.

J. Immunol. 83, 334-338.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):

Identification of enterotoxin E.

Infec. Immun. 4, 593-595.

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137.

Biochem. 6, 1467-1473.

BERGMEYER, H.U. (1974):

Methoden der enzymatischen Analyse, Band 1.

Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

BURIS, L., I. SZILAGYI und K. ZSIGMOND (1967):

Histological and histochemical examinations in experimental staphylococcal enterotoxin poisoning.

Acta Med. Leg. Soc. (Liege) 20, 195-196.

CANONICO, P.G. (1973):

Lysosomal catabolism of a protein toxin: staphylococcal enterotoxin B.

Biochim. Biophys. Acta 322, 251-257.

CANONICO, P.G. und M.J. VAN ZWIETEN (1971):

Swelling of mitochondria from rabbit liver induced by staphylococcal enterotoxin B.

J. Infect. Dis. 124, 372-378.

CANONICO, P.G., E.L. HENRIKSEN, E. AYALA und D.G. BOWMAN (1974):

Subcellular localization of staphylococcal enterotoxin B in rabbit kidney.

Am. J. Physiol. 226, 1333-1337.

CASMAN, E.P. (1960):

Further serological studies of staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 79, 849-856.

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.

J. Bact. 94, 1875-1882.

CHU, F.S., K. THADHANI, E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1966):

Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A. *Biochemistry* 5, 3281-3289.

CLARK, W.G. und J.S. PAGE (1968):

Pyrogenic responses to staphylococcal enterotoxins A and B in cats. *J. Bact.* 96, 1940-1946.

CRAWLEY, G.J., I. GRAY, W.A. LEBLANG und J.W. BLANCHARD (1966a):

Blood binding, distribution and excretion of staphylococcal enterotoxins in monkeys.

J. Infect. Dis. 116, 48-56.

CRAWLEY, G.J., J.N. BLACK, I. GRAY und J.W. BLANCHARD (1966b):

Clinical chemistry of staphylococcal enterotoxin poisoning in monkeys. *Appl. Microbiol.* 14, 445-450.

DANGERFIELD, H.G. (1973):

Effect of enterotoxins after ingestion by humans.

Vortrag, Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.

EINÖDER, T. (1979):

Der Nachweis von Antikörpern gegen Staphylokokken-Enterotoxin B mittels Agar-Gel-Präzipitation, ELISA und RIA nach parenteraler und aerogener Immunisierung von Kaninchen.

Vet. med. Diss., München

ELIAS, J. und R. SHIELDS (1976):

Influence of staphylococcal enterotoxin on water and electrolyte transport in the small intestine.

Gut 17, 527-535.

ELWELL, M.R., C.T. LIU, R.O. SPERTZEL und W.R. BEISEL (1975):

Mechanisms of oral staphylococcal enterotoxin B-induced emesis in the monkey.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 424-427.

FINEGOLD, M.J. (1967):

Interstitial pulmonary edema, an electrone microscope study of the pathology of staphylococcal enterotoxemia in Rhesus-monkeys.

Lab. Invest. 16, 912-924.

FORSQREN, A., U. FORSUM und H.O. HALLANDER (1972):

Failure to detect cell-associated enterotoxin B in *Staphylococcus aureus* by immunofluorescence.

Appl. Microbiol. 23, 559-564.

FORSUM, U. und A. FORSGREN (1972):

Immunofluorescent detection of enterotoxin B from *S. aureus*.
Toxicon 10, 451-456.

FRIEDMAN, M.E. und J.D. WHITE (1965):

Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin B.
J. Bact. 89, 1155.

GABLIKS, J. (1972):

Protective action of 2,2-bis(parachlorophenyl) -1,1,1-trichlorethane against intoxication of cells by staphylococcal enterotoxin B.
Infec. Immun. 6, 364-369.

GANTZE, K. (1976):

Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin in Lebensmitteln mittels Froschspermatest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.
Vet. med. Diss., München

GENIGEORGIS, C. und W.W. SADLER (1966a):

Immunofluorescent detection of staphylococcal enterotoxin B.
I. Detection in culture media.
J. Food Sci. 31, 441-449.

DIESELBEN (1966b):

Immunofluorescent detection of staphylococcal enterotoxin B.
II. Detection in foods.
J. Food Sci. 31, 605-609.

GRAHAM, R.C. und M.J. KARNOVSKY (1966):

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302.

GRAHAM, R.C., U. LUNDHOLM und M.J. KARNOVSKY (1965):

Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole.
J. Histochem. Cytochem. 13, 150-152.

GREAVES, M., G. JANOSSY und M. DOENHOFF (1974):

Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens.
J. Exp. Med. 140, 1-18.

GRIGOROVA, M. und S. DANON (1968):

The effect of staphylococcal enterotoxin on tissue cultures.
Zbl. Bakt. I Orig. 206, 478-481.

- HALLANDER, H.O. und S. BENGTSSON (1967):
Studies on the cell toxicity and species specificity of purified staphylococcal toxins.
Acta path. et microbiol. scandinav. 70, 107-119.
- HELBER, W. (1977):
Zur Inaktivierung von Staphylokokkenenterotoxin B mittels chemischer Verfahren.
Vet. med. Diss., München
- HOPPER, S.H. (1963):
Detection of staphylococcus enterotoxin.
I. Flotation antigen-antibody system.
J. food Sci. 28, 572-577.
- HUANG, I.Y., E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1975):
The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins.
Jpn. J. Med. Sci. Biol. 28, 73-75.
- JOSEFCZYK, Z. (1973):
Presence of antienterotoxins A and B in human serum in staphylococcal infection.
Contrib. Microbiol. Immunol. 1, 448-449.
- KAPLAN, J. (1972):
Staphylococcal enterotoxin B induced release of macrophage migration inhibition factor from normal lymphocytes.
Cell. Immunol. 3, 245-252.
- KAWAMURA, A. (1969):
Fluorescent antibody techniques and their applications.
University of Tokyo Press, Tokyo.
- KENT, T.H. (1966):
Staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in Rhesus monkeys.
Am. J. Pathol. 48, 387-398.
- KENT, T.H., H.R. JERVIS und J.G. KUHN (1966):
Enzyme histochemistry of acute staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in Rhesus monkeys.
Am. J. Pathol. 48, 667-681.
- KIENTZ, M. und G. SCHMELTER (1964):
Untersuchungen über den Einfluß von Staphylokokkenterotoxinen auf Affen-nierenzellkulturen.
Zbl. Bakt. I Orig. 193, 447-453.
- LACHICA, R.V., K.F. WEISS und R.H. DEIBEL (1969):
Relationship among coagulase, enterotoxin and heat-stable desoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*.
Appl. Microbiol. 18, 126-127.

LANGFORD, M.P., G.J. STANTON und H.M. JOHNSON (1978):
Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human periphe-
ral lymphocytes.
Infect. Immun. 22, 62-68.

LIU, C.T., R.D. DELAUTER und R.T. FAULKNER (1977):
Cardiovascular and hepatic responses of Rhesus Macaques to staphy-
lococcal enterotoxin B.
Am. J. Vet. Res. 38, 1849-1854.

LIU, C.T., M.J. GRIFFIN und R.T. FAULKNER (1976):
Effect of staphylococcal enterotoxin B on body fluid compartments in
conscious Rhesus monkeys.
J. Med. Primatol. 5, 336-344.

LIU, C.T., M.J. GRIFFIN und D.E. HILMAS (1978):
Effect of staphylococcal enterotoxin B on cardiorenal functions and
survival in X-irradiated Rhesus Macaques.
Am. J. Vet. Res. 39, 1213-1217.

LIU, C.T., J.D. HELM und W.R. BEISEL (1976):
Cardiovascular and vomiting responses to a lethal intravenous dose of
staphyloenterotoxin A in Rhesus monkeys.
J. Med. Primatol. 5, 353-359.

LIU, C.T., R.D. DELAUTER, M.J. GRIFFIN und R.T. FAULKNER
(1978):
Effect of staphylococcal enterotoxin B on cardiorenal functions in
Rhesus Macaques.
Am. J. Vet. Res. 39, 279-286.

LOCHER, E. (1977):
Zur Stabilität von Enterotoxin B gegenüber physikalischen Einflüssen.
Vet. med. Diss., München

LOTTER, L.P. und C.A. GENIGEORGIS (1977):
Isolation of coagulase-positive variants from coagulase-negative
enterotoxigenic staphylococci.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 239, 18-30.

MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2, 235-254.

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1974):
Virologische Arbeitsmethoden, Band 1.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

DIESELBEN (1977):
Virologische Arbeitsmethoden, Band 2.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Mc GANN, V.G., J.B. ROLLINS und D.W. MASON (1971):
Evaluation of resistance to staphylococcal enterotoxin B:
naturally acquired antibodies of man and monkey.
J. Infect. Dis. 124, 206-213.

Mc INTOSH, M.E. und D.D. WATT (1971):
In vitro anaphylactic response to staphylococcal enterotoxin.
Toxicon 9, 163-168.

MERRILL, T.G. und H. SPRINZ (1968):
The effect of staphylococcal enterotoxin on the fine structure of the
monkey jejunum.
Lab. Invest. 18, 114-123.

MEYER, G., J. HINTERBERGER und R. KORTE (1977):
Detoxifizierung von Staphylokokken-Enterotoxin B im Wasser.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164, 352-359.

MILONE, N.A. (1962):
Studies on the use of tissue culture for the bioassay of staphylococcal
enterotoxin.
J. Food Sci. 27, 501-507.

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1976):
Staphylococci and their significance in food.
Elsevier scientific publishing company, Amsterdam-Oxford-New York.

MORRIS, E.L., L.F. HODOVAL und W.R. BEISEL (1967):
The unusual role of the kidney during intoxication of monkeys by in-
travenous staphylococcal enterotoxin B.
J. Infect. Dis. 117, 273-284.

NAIRN, R.C. (1969):
Fluorescent protein tracing.
E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London

NORMANN, S.J. (1970):
Why antibody inhibits vascular clearance of staphylococcal enterotoxin B.
J. Immunol. 104, 673-678.

DERSELBE (1971):
Renal fate of staphylococcal enterotoxin B.
Lab. Invest. 25, 126-132.

NORMANN, S.J. und C.M. STONE (1972):
Renal lysosomal catabolism of staphylococcal enterotoxin B.
Lab. Invest. 27, 236-241.

NORMANN, S.J., R.F. JAEGER und R.T. JOHNSEY (1969):
Pathology of experimental enterotoxemia - The in vivo localization
of staphylococcal enterotoxin B.
Lab. Invest. 20, 17-25.

PALMER, E.D. (1951):
The morphologic consequences of acute exogenous (staphylococci)
gastroenteritis on the gastric mucosa.
Gastroenterology 19, 462-475.
zit. nach BERGDÖLL, M.S. (1970)

PEAVY, D.L., W.H. ADLER und R.T. SMITH (1970):
The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B
on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes.
J. Immunol. 105, 1453-1458.

PETTIT, G.W., M.R. ELWELL und P.B. JAHRLING (1977):
Possible endotoxemia in rabbits after intravenous injection of
Staphylococcus aureus enterotoxin B.
J. Infect. Dis. 135, 646-648.

PETTIT, G.W., T. YAMADA, D.A. WING und P.B. JAHRLING (1978):
Enterotoxic shock in Rhesus monkeys. The role of selected blood-
borne factors.
Circ. Res. 43, 398-405.

PINTO, M., M. TORTEN und S.C. BIRNBAUM (1978):
Suppression of the in vivo humoral and cellular immune response
by staphylococcal enterotoxin B (SEB).
Transplantation 25, 320-323.

RAJ, H.D. und M.S. BERGDÖLL (1969):
Effect of enterotoxin B on human volunteers.
J. Bact. 98, 833-834.

RAKAROWA, N., S. STEFANOWA und I. STANKOWA (1971):
Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin A in Gewebekulturen.
Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A 218, 45-48.

RAPOPORT, M.I., L.F. HODOVAL und W.R. BEISEL (1967):
Influence of Thorotrast blockade and acute renal artery ligation on
disappearance of staphylococcal enterotoxin B from blood.
J. Bact. 93, 779-783.

RHODA, D.A., und W.R. BEISEL (1970):
Lymph production during staphylococcal B enterotoxemia-induced
shock in monkeys.
Am. J. Vet. Res. 31, 1845-1851.

RHODA, D.A., D.D. ELSBERRY und W.R. BEISEL (1970):
Fluid compartment alterations in the monkey with staphylococcal B enterotoxemia.

Am. J. Vet. Res. 31, 507-514.

SCHAEFFER, W.I. (1970):

Interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures.

Infect. Immun. 1, 455-458.

SCHAEFFER, W.I., J. GABLIKS und R. CALITIS (1966):

Interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures of human embryonic intestine.

J. Bact. 91, 21-26.

DIESELBEN (1967):

Interference by trypsin in the interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures of human embryonic intestine.

J. Bact. 93, 1489-1492.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO,

D.A. DUNNERY und M.S. BERGDOLL (1965):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Biochem. 4, 1011-1016.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, M.J. WOODBURN, J.M. LYNCH,

H.M. JACOBY, S.J. SIVERMAN, J.C. GORMAN und L. SPERO (1972):

Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A.

Biochemistry 11, 360-366.

SCHEGGER, G. (1978):

Zum Abtrennen und Einengen von Staphylokokken-Enterotoxin B aus Lebensmitteln mit Hilfe der Ultrafiltration.

Vet. med. Diss., München

SCHULTE, L. (1978):

Zur Stabilität von Staphylokokkenenterotoxin A gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen.

Vet. med. Diss., München

SHEMANO, I., J.F. HITCHENS und J.M. BEILER (1967):

Paradoxical intestinal inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin.

Gastroenterology 53, 71-77.

SIMON, E. (1978):

Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln am Modell des Enterotoxin B nach dem ELISA-Prinzip.

Vet. med. Diss., München

SMITH, B.G. und D.L. ARCHER (1978):

Inhibition of the in vitro antibody response by staphylococcal enterotoxin E.

Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p. 71

SMITH, B.G. und H.M. JOHNSON (1975):

The effect of staphylococcal enterotoxins on the primary in vitro immune response.

J. Immunol. 115, 575-578.

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137.

SPERO, L., D.L. LEATHERMAN und W.H. ADLER (1975):

Mitogenicity of formalinized toxoids of staphylococcal enterotoxin B.

Infect. Immun. 12, 1018-1020.

STAAB, E.V., J. NIEDERHUBER, D.A. RHODA, C.S. FAULKNER I und W.R. BEISEL (1969):

Role of the kidney in staphylococcal enterotoxemia.

Appl. Microbiol. 17, 394-398.

STARK, R.L. und P.R. MIDDAUGH (1969):

Immunofluorescent detection of enterotoxin B in food and a culture medium.

Appl. Microbiol. 18, 631-635.

DIESELBEN (1970):

Immunofluorescent detection of enterotoxin B produced under CO₂ and N₂ atmospheres.

Appl. Microbiol. 20, 519-520.

STAVROU, D., U. OSTERKAMP, B. SCHRÖDER, A.P. ANZIL und K. ZÄNKER (1979):

Selected morphological immunocytochemical and growth characteristics of three experimental rat gliomas and of their cells in vitro.

Expl. Cell Biol. 47, 3 - 21.

STILES, J.W. und J.C. DENNISTON (1971):

Response of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) to continuously infused staphylococcal enterotoxin B.

Lab. Invest. 25, 617-625.

SUGIYAMA, H. und T. HAYAMA (1965):

Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey.

J. Infect. Dis. 115, 330-335.

- SUGIYAMA, H. und E.M. McKISSIC (1966):
Leukocytic response in monkeys challenged with staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 92, 349-352.
- SUGIYAMA, H., K.L. CHOW und L.R. DRAGSTEDT (1961):
Study of emetic receptor sites for staphylococcal enterotoxin in monkeys.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108, 92 - 95.
- SULLIVAN, R. (1969):
Effects of enterotoxin B on intestinal transport in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 1159-1162.
- SULLIVAN, R. und T. ASANO (1971):
Effects of staphylococcal enterotoxin B on intestinal transport in the rat.
Am. J. Physiol. 220, 1793-1797.
- SUSSMAN, M., C. RYAN und R. SHIELDS (1970):
Effect of staphylococcal enterotoxin upon the intestinal handling of water and electrolytes.
Brit. J. Surg. 57, 391.
- TADOKORO, I. und Y. TOKUSHIGE (1969):
Staphylococci: An approach to analysis of microbial structure, invasion of α -toxin into Ehrlich ascites tumor cells and formation of kidney abscesses in mice,
in: KAWAMURA, A. (1969).
- TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1976):
Unveröffentlichte Untersuchungen.
zit. nach ZIETZER, A. (1978)
- THOTA, H., S.R. TATINI und R.W. BENNETT (1973):
Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F.
Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p. 1.
- URBACH, H., H. OEHRING und H. BRUNNENMANN (1968):
Versuche zum Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins mit Hilfe von Zellkulturen.
Arch. Hyg. 152, 504-508.
- WARREN, J.R. (1977):
Mitogenic stimulation of murine spleen cells by brief exposure to Staphylococcus aureus enterotoxin B.
Infect. Immun. 18, 99-101.

WARREN, J.R., D.L. LEATHERMAN und J.F. METZGER (1975):
Evidence for cell-receptor activity in lymphocyte stimulation by
staphylococcal enterotoxin.
J. Immunol. 115, 49-53.

WILSON, B.J. (1959):
Comparative susceptibility of chimpanzees and Macaca mulatta monkeys
to oral administration of partially purified staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 78, 240-242.

ZAADHOF, K.-J. (1978):
Der Thernonucleasetest - Verfahren zum Nachweis der Staphylo-
kokken-Vermehrung in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 138.

ZIETZER, A. (1978):
Biologische und serologische Aktivität von Staphylokokken-Enteroto-
xin B nach Einwirkung physikalischer und chemischer Verfahren.
Vet. med. Diss., München

Herrn Professor Dr. G. Terplan danke ich für die Überlassung des Themas und für die Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. D. Stavrou möchte ich für seine Hilfestellung und Ratschläge danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für die fachliche Beratung und Unterstützung bei der Fertigstellung des schriftlichen Teils der Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für ihre freundliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 15. Januar 1951 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Friedrich Nützel und seiner Ehefrau Margarete, geb. Lüchauer, in Bayreuth geboren.

Nach dem Besuch der Luitpold-Volksschule von 1957-1961 erfolgte der Übertritt in das Graf-Münster-Gymnasium in Bayreuth, wo ich 1971 die Reifeprüfung ablegte. In der Zeit von Juli 1971 bis Dezember 1972 leistete ich den Wehrdienst ab.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im November 1977 mit der erfolgreichen Ablegung des Staatsexamens beendete. Im Januar 1978 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

In den Jahren 1978 und 1979 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München beschäftigt.

